

明 細 書

心筋細胞への分化能を有する細胞

技術分野

本発明は、心筋細胞への分化能を有する細胞の単離、精製、培養、分化誘導法に関する。また本発明は、各種サイトカイン、転写因子などを用いた、心筋細胞への分化能を有する細胞の増殖方法および心筋細胞への分化を制御する方法に関する。本発明はさらに、心筋細胞への分化能を有する細胞に特異的な表面抗原の取得方法、該表面抗原をコードする遺伝子の取得方法、該表面抗原特異的な抗体の取得方法、心筋細胞への分化能を有する細胞の増殖および心筋細胞への分化に関与する蛋白質および遺伝子の取得方法に関する。本発明はまた、心筋細胞への分化能を有する細胞を用いた各種心臓疾患の治療薬に関する。

背景技術

心筋細胞は、出生前は自律拍動しながら活発に細胞分裂を行っている。しかし、出生と同時にその分裂能は喪失し、肝細胞のように再び細胞分裂能を獲得することはなく、また骨格筋細胞とも異なり衛星細胞といった未分化な前駆細胞を持つこともない。従って、心筋梗塞、心筋炎または老化等に伴い心筋細胞が壊死すると、生体内では残存心筋細胞の細胞分裂ではなく細胞の肥大がおきる。心肥大は初期においては生理的適応であるが、また共存する心線維芽細胞の増殖による間質の線維化と相まって心臓自体の拡張機能の低下、さらには収縮機能の低下へと結びつき心不全を呈するようになる。心筋梗塞等による心不全のこれまでの治療は心収縮力の増強、血管拡張薬による心臓の圧負荷・容量負荷の軽減、利尿薬による血流量の減少等の対症療法を中心に行われてきた。これに対し、心臓移植は重症心不全に対する根本的な治療法であるが、臓器提供者の不足、脳死判定の難しさ、拒絶反応、医療費の高騰等の問題から心臓移植が一般的な医療に普及するのは簡単ではない。実際、心臓病は我が国の死亡原因の第3位となっており(厚生白書平成10年)、失われた心筋細胞を再生することができれば医療福祉の大きな前進につながると考えられる。

現在までに、心筋細胞の性質を保存した細胞株としては、心房性ナトリウム利尿ホルモン

のプロモーターに SV40 の large T 抗原を組み換えて作製したトランスジェニックマウスの心房に生じた腫瘍から株化された AT-1 細胞があげられる[Science, 239; 1029-1038 (1988)]。しかしながら、該細胞は in vivo に移植すると腫瘍を形成するため、細胞移植には適さないという問題がある。そこで、このような背景のもと、心筋を再構築するため以下の方法が考えられた。

1つ目の方法は、心筋細胞以外の細胞を心筋細胞に変換する方法である。これは、線維芽細胞に MyoD を導入すると骨格筋細胞に変換できることから類推された。これまでに、マウスの胎児性癌細胞である P19 細胞での成功例は示されているものの[Cell Struc. & Func., 21; 101-110 (1996)]、非ガン細胞での成功例は報告されていない。

2つ目の方法は、心筋細胞に再び分裂能を付与する方法である。これは、胎児期に心筋が拍動しながら分裂できる現象に基づいている。しかしながら、これまでに成功例は報告されていない。

3つ目の方法は、未分化な幹細胞から心筋細胞を誘導する方法である。すでに、胚性幹細胞 (ES 細胞) から心筋細胞を誘導できることが示されているが、胚性幹細胞自身を成体に移植するとカルシノーマを形成すること、抗原性などの問題が存在する[Nature Biotechnology, 17, 139-142 (1999)]。

従って、胚性幹細胞を現実の医療へと応用するためには、少なくとも心筋前駆細胞あるいは、心筋細胞を純粋に精製する技術が不可欠である。抗原性の問題はクローン化の技術により解決できる可能性は示唆されているが、煩雑な操作を必要とすることから一般的な医療への応用は容易ではない。

中絶胎児から未分化な細胞である心筋前駆細胞を取得して移植に用いる方法も考えられており、動物を用いた実験では心筋細胞として有効に機能することが知られている[Science, 264, 98-101 (1994)]。しかしながら、この方法で大量の心筋前駆細胞を取得することは困難であり、倫理の観点からも一般的な医療への応用は容易ではない。

成体骨髄には造血系幹細胞および血管幹細胞以外に間葉系幹細胞が存在し、間葉系幹細胞からは骨細胞、軟骨細胞、腱細胞、靱帯細胞、骨格筋細胞、脂肪細胞、ストローマ細胞、肝臓 oval 細胞が分化誘導できることが報告されている[Science, 284, 143-147 (1999); Science, 284, 1168-1170 (1999)]。一方、最近、マウス成体の骨髄から取得した細

胞から、心筋細胞が分化誘導できることを見い出した[J. Clinical Investigation, 103, 10-18 (1999)]。該報告は患者自身から骨髓液を取得して、in vitro で細胞培養および薬剤処理を行った後に、心臓の障害部位へ移植する細胞治療が現実的な医療として可能になることを示唆している[J. Clinical Investigation, 103, 591-592 (1999)]。しかしながら、該報告は、成体マウスの骨髓から樹立した不死化細胞の一部が心筋細胞に分化できることを示したものにすぎない。また、成体骨髓中の心筋細胞に分化する能力を有する細胞の特性の同定、該細胞を増殖する方法、該細胞から効率的に心筋細胞に分化誘導する方法については明らかでなかった[J. Clinical Investigation, 103, 591-592 (1999)]。

生体内の組織から目的の細胞を取得する方法として、各種表面抗原を認識する抗体が用いられている。例えば、未熟な造血幹細胞では CD34+/CD38-/HLA-DR-/CD90(Thy-1)+の特性を有していること、また、造血幹細胞が分化するに従い、CD38 が発現し CD90(Thy-1)が消失することが知られている[蛋白質核酸酵素 Vol. 45, No13, 2056-2062(2000)]。血管内皮細胞では、CD 34、CD 31、Flk-1、Tie-2、E-セレクトリン等のマーカーを発現しており[分子心血管病Vol. 1, No. 3, 294-302(2000)]、骨髓の間葉系幹細胞では CD 90、CD 105、CD 140等のマーカーを発現している[Science, 284, 143-147 (1999); Science, 284, 1168-1170 (1999)]。しかしながら、心筋や血管内皮細胞を誘導できる幹細胞の表面マーカーについては明らかにされていない。

発明の開示

現在の心疾患治療より安全かつ確実な治療が望まれている。そこで、骨髓細胞などの生体組織または臍帯血より心筋細胞への分化能を有する細胞を選別し、心筋細胞への分化能を有する細胞の増殖または分化をコントロールすることは、骨髓由来の細胞などの生体細胞または臍帯血を用いた心筋の再生治療の開発に有用である。そのために、心筋細胞への分化能を有する細胞を単離して、該細胞の増殖または分化に働くサイトカインまたは転写因子を同定することが必要である。

本発明者は上記問題点を開発すべく鋭意研究し、以下の結果を得た。すなわち、マウス骨髓由来の細胞を1細胞レベルにまず分離を行い、多数の細胞株を取得した。これら細胞株を一つ一つ、5-アザシチジン処理を行うことで心筋形成能を有する細胞株を複数取得

した。次に選られた細胞株を、GFP(Green Fluorescent Protein)を発現するレトロウイルスベクターを用いて標識し、1つの細胞を蛍光顕微鏡下で追跡することで、骨髓由来の細胞が、心筋細胞および脂肪細胞の少なくとも2種類の異なる細胞を分化誘導できる多分化能(Purulipotent)を持った幹細胞であることを見出した。さらに、該幹細胞は5-アザシチジンだけでなく、DMSO(dimethyl sulfoxide)などの他のゲノムDNAの脱メチル化剤の投与によっても、確率的(stochastic)に心筋細胞、脂肪細胞および骨格筋細胞の系列に分化することを見出し、ゲノムDNAの脱メチル化が骨髓由来の細胞からの心筋細胞への分化誘導に有効であることを明らかにした。またFGF-8, ET1, Midkine, BMP4の4種類のうち少なくとも一種のサイトカインと5-アザシチジンとを組み合わせることで骨髓由来の細胞に心筋特異的な遺伝子である ANP(atrial natriuretic peptide)および cTnI(cardiac Troponin I)の発現を促進できることを見出した。同様に Nkx2.5 および GATA4 の2種類の転写因子をウイルスベクターを用いて骨髓由来細胞に強制発現を行った後、5-アザシチジン処理を行うことで、心筋細胞への分化が約50倍促進できることを見出した。また骨髓由来の細胞を心筋細胞の細胞外基質をコートした培養皿で培養することで、骨髓由来の細胞に心筋特異的な遺伝子である ANP および cTnI の発現を特異的に促進できることを見出した。さらに、骨髓由来の細胞を心筋由来の初代培養細胞と共培養を行うことで骨髓由来の細胞から心筋の形成が約10倍促進することを見出した。また、Nkx2.5, GATA4 の2種類の転写因子をウイルスベクターを用いて骨髓由来細胞に強制発現させることと、心筋細胞との共培養を組み合わせることで、約500倍心筋への分化が促進することを見出した。

次に移植実験により、骨髓由来の細胞の分化能力を検討した。まずマウス成体心臓に移植することで、骨髓由来の細胞が心筋と血管に分化することを見出した。さらに成体マウスの筋肉に移植することで骨格筋を形成できることを見出した。またマウス胚盤胞に移植すると、誕生したマウスの中枢神経系、肝臓、心臓で移植した細胞由来の組織が形成された。中枢神経系は外胚葉系、肝臓は内胚葉系、心臓は中胚葉系の組織である。

これらの結果は、本発明で見出した骨髓由来の細胞が、今まで知られていた骨髓に存在する造血系組織にのみ分化する造血幹細胞および骨格筋、脂肪細胞、骨などの沿軸中胚葉系組織にのみ分化する間葉系幹細胞とは異なる性質、すなわち外胚葉系、中胚葉系および内胚葉系の3胚葉すべてに分化できる全能性を有していることを示している。

また、本発明の骨髄由来の細胞を造血系細胞の表面抗原であるCD 34、CD 117、CD 14、CD 45、CD 90、Sca-1、Ly6c、Ly6gを認識する抗体、血管内皮細胞の表面抗原であるFlk-1、CD 31、CD 105、CD 144を認識する抗体、間葉系細胞の表面抗原であるCD 140を認識する抗体、インテグリンの表面抗原であるCD 49b、CD 49d、CD 29、CD 41を認識する抗体、マトリックス受容体であるCD 54、CD 102、CD 106、CD 44を認識する抗体などを用いて骨髄由来の細胞の表面抗原の発現を解析することにより、今までに知られていない全く新しい発現形態を示している全能性の幹細胞であることを見出し、本発明を完成させた。

すなわち、本発明は以下の(1)～(91)を提供するものである。

(1) 生体組織または臍帯血から単離され、少なくとも心筋細胞に分化する能力を有する細胞。

(2) 生体組織が骨髄である、上記(1)記載の細胞。

(3) 細胞が、多分化能幹細胞であることを特徴とする、上記(1)または(2)記載の細胞。

(4) 細胞が、少なくとも心筋細胞、血管内皮細胞に分化する能力を有する多分化能幹細胞である、上記(1)～(3)のいずれか1項に記載の細胞。

(5) 細胞が、少なくとも心筋細胞、脂肪細胞、骨格筋細胞、骨芽細胞、血管内皮細胞に分化する能力を有する多分化能幹細胞である、上記(1)～(4)のいずれか1項に記載の細胞。

(6) 細胞が、少なくとも心筋細胞、脂肪細胞、骨格筋細胞、血管内皮細胞、骨芽細胞、神経系細胞、肝細胞に分化する能力を有する多分化能幹細胞である、上記(1)～(5)のいずれか1項に記載の細胞。

(7) 細胞が、成体組織のいかなる細胞にも分化する能力を有する全能性幹細胞であることを特徴とする、上記(1)～(3)記載の細胞。

(8) 細胞が CD 117陽性および CD 140陽性である、上記(1)～(7)のいずれか1項に記載の細胞。

(9) 細胞が、さらに CD 34陽性である、上記(8)記載の細胞。

(10) 細胞が、さらに CD 144陽性である、上記(9)記載の細胞。

- (11) 細胞が、さらに CD 144陰性である、上記(9)記載の細胞。
- (12) 細胞が、CD 34陰性である、上記(8)記載の細胞。
- (13) 細胞が、さらに CD 144陽性である、上記(12)記載の細胞。
- (14) 細胞が、さらに CD 144陰性である、上記(12)記載の細胞。
- (15) 細胞が、さらに CD 14陰性、CD 45陰性、CD 90陰性、Flk-1陰性、CD 31陰性、CD 105陰性、CD 49b陰性、CD 49d陰性、CD 29陽性、CD 54陰性、CD 102陰性、CD 106陰性および CD 44陽性である、上記(10)記載の細胞。
- (16) 細胞が、さらに CD 14陰性、CD 45陰性、CD 90陰性、Flk-1陰性、CD 31陰性、CD 105陰性、CD 49b陰性、CD 49d陰性、CD 29陽性、CD 54陰性、CD 102陰性、CD 106陰性および CD 44陽性である、上記(11)記載の細胞。
- (17) 細胞が、さらに CD 14陰性、CD 45陰性、CD 90陰性、Flk-1陰性、CD 31陰性、CD 105陰性、CD 49b陰性、CD 49d陰性、CD 29陽性、CD 54陰性、CD 102陰性、CD 106陰性および CD 44陽性である、上記(12)記載の細胞。
- (18) 細胞が、さらに CD 14陰性、CD 45陰性、CD 90陰性、Flk-1陰性、CD 31陰性、CD 105陰性、CD 49b陰性、CD 49d陰性、CD 29陽性、CD 54陰性、CD 102陰性、CD 106陰性および CD 44陽性である、上記(13)記載の細胞。
- (19) Hoechst 33342を取り込まない、上記(1)記載の細胞。
- (20) 上記(1)～(19)のいずれか1項に細胞から誘導される心筋細胞のみに分化誘導される心筋前駆細胞。
- (21) 心室筋細胞に分化する能力を有する、上記(1)～(20)のいずれか1項に記載の細胞。
- (22) 洞結節細胞に分化する能力を有する、上記(1)～(20)のいずれか1項に記載の細胞。
- (23) 生体組織または臍帯血がほ乳動物由来のものである、上記(1)～(20)のいずれか1項に記載の細胞。
- (24) ほ乳動物がマウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギ、ネコ、イヌ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ヤギ、サルおよびヒトから選ばれる1種である、上記(23)記載の細胞。
- (25) 細胞が、マウス骨髓由来多分化能幹細胞 BMSC(FERM BP-7043)である、上記

(1)～(8)のいずれか1項に記載の細胞。

(26) 染色体 DNA の脱メチル化により心筋細胞に分化する能力を有する、上記(1)～(25)のいずれか1項に記載の細胞。

(27) 染色体 DNA の脱メチル化が、デメチラーゼ、5-アザシチジンおよびジメチルスルフォキシド(DMSO)からなる群から選ばれる少なくとも1種によるものであることを特徴とする、上記(26)記載の細胞。

(28) デメチラーゼが、配列番号1記載で表されるアミノ酸配列を有するデメチラーゼである、上記(27)記載の細胞。

(29) 胎児の心臓発生領域で発現している因子または胎児の心臓発生段階において心筋細胞への分化に働く因子により心筋細胞への分化が促進される上記(1)～(28)のいずれか1項に記載の細胞。

(30) 胎児の心臓発生領域で発現している因子または胎児の心臓発生段階において心筋細胞への分化に働く因子がサイトカイン、接着分子、ビタミン、転写因子および細胞外基質からなる群から選ばれる少なくとも1種であることを特徴とする、上記(29)記載の細胞。

(31) サイトカインが血小板由来増殖因子(PDGF)、繊維芽細胞増殖因子8(FGF-8)、エンドセリン1(ET1)、ミドカイン(Midkine)および骨形成因子4(BMP-4)からなる群から選ばれる少なくとも1種である、上記(30)記載の細胞。

(32) PDGF が配列番号3または5で表されるアミノ酸配列、FGF-8 が配列番号64で表されるアミノ酸配列、ET1 が配列番号66で表されるアミノ酸配列、ミドカインが配列番号68で表されるアミノ酸配列、BMP-4 が配列番号70で表されるアミノ酸配列をそれぞれ有する、上記(31)記載の細胞。

(33) 接着分子がゼラチン、ラミニン、コラーゲンおよびフィブロネクチンからなる群から選ばれる少なくとも1種である、上記(30)記載の細胞。

(34) ビタミンがレチノイン酸である、上記(30)記載の細胞。

(35) 転写因子が、Nkx2)5/Csx、GATA4、MEF-2A、MEF-2B、MEF-2C、MEF-2D、dHAND、eHAND、TEF-1、TEF-3、TEF-5 および MesP1 からなる群から選ばれる少なくとも1種である、上記(30)記載の細胞。

(36) Nkx2)5/Csx が配列番号9で表されるアミノ酸配列、GATA4 が配列番号11で表さ

れるアミノ酸配列、MEF-2A が配列番号13で表されるアミノ酸配列、MEF-2B が配列番号15で表されるアミノ酸配列、MEF-2C が配列番号17で表されるアミノ酸配列、MEF-2D が配列番号19で表されるアミノ酸配列、dHAND が配列番号21で表されるアミノ酸配列、eHAND が配列番号23で表されるアミノ酸配列、TEF-1 が配列番号25で表されるアミノ酸配列、TEF-3 が配列番号27で表されるアミノ酸配列、TEF-5 が配列番号29で表されるアミノ酸配列、MesP1 が配列番号62で表されるアミノ酸配列をそれぞれ有する、上記(35)記載の細胞。

(37) 細胞外基質が心筋細胞由来の細胞外基質であることを特徴とする上記(30)記載の細胞。

(38) 線維芽細胞増殖因子-2 (FGF-2) により心筋細胞への分化が抑制される上記(1)～(28)のいずれか1項に記載の細胞。

(39) FGF-2 が配列番号7または8記載のアミノ酸配列を有する FGF-2 である、上記(38)記載の細胞。

(40) 心臓に移植することにより心筋細胞または血管に分化する能力を有する上記(1)～(28)のいずれか1項に記載の細胞。

(41) 胚盤胞に移植すること、または心筋細胞と共培養を行うことにより、心筋に分化する能力を有する上記(1)～(28)のいずれか1項に記載の細胞。

(42) 核内受容体 PPAR- γ を活性化因子により脂肪細胞に分化する能力を有する上記(1)～(28)のいずれか1項に記載の細胞。

(43) 核内受容体 PPAR- γ の活性化因子がチアゾリジオン骨格を有する化合物であることを特徴とする上記(42)記載の細胞。

(44) チアゾリジオン骨格を有する化合物がトログリタゾン、ピオグリタゾン、ロジグリタゾンからなる群から選ばれる少なくとも1種である、上記(43)記載の細胞。

(45) 胚盤胞に移植すること、または脳または脊髄に移植することにより、神経系細胞に分化する能力を有する上記(1)～(28)のいずれか1項に記載の細胞。

(46) 胚盤胞に移植すること、または肝臓に移植することにより、肝細胞に分化する能力を有する上記(1)～(28)のいずれか1項に記載の細胞。

(47) 染色体 DNA の脱メチル化剤を用いて、上記(1)～(28)のいずれか1項に記載の

細胞から心筋を形成する方法。

(48) 染色体 DNA の脱メチル化剤を用いて、上記(9)記載の細胞から上記(12)記載の細胞へ脱分化させる方法。

(49) 染色体 DNA の脱メチル化剤を用いて、CD 117陰性および CD 140陽性の細胞から上記(8)記載の細胞へ脱分化させる方法。

(50) 染色体 DNA の脱メチル化剤が、デメチラーゼ、5-アザシチジンおよび DMSO からなる群から選ばれる少なくとも1種であることを特徴とする、上記(48)および(49)記載の方法。

(51) デメチラーゼが、配列番号1記載のアミノ酸配列で表されるデメチラーゼである、上記(50)記載の方法。

(52) 胎児の心臓発生領域で発現している因子または胎児の心臓発生段階において心筋細胞への分化に働く因子を用いることを特徴とする、上記(1)～(28)のいずれか1項に記載の細胞から心筋を形成する方法。

(53) 胎児の心臓発生領域で発現している因子または胎児の心臓発生段階において心筋細胞への分化に働く因子が、サイトカイン、接着分子、ビタミン、転写因子および細胞外基質からなる群から選ばれる少なくとも1種であることを特徴とする、上記(52)記載の方法。

(54) サイトカインが PDGF、繊維芽細胞増殖因子8(FGF-8)、エンドセリン1(ET1)、ミドカイン(Midkine)および骨形成因子4(BMP-4)からなる群から選ばれる少なくとも1種である、上記(53)記載の方法。

(55) PDGFが配列番号3または5記載のアミノ酸配列、FGF-8が配列番号64のアミノ酸配列、ET1が配列番号66で表されるアミノ酸配列、ミドカインが配列番号68で表されるアミノ酸配列、BMP-4が配列番号70で表されるアミノ酸配列をそれぞれ有する、上記(54)記載の方法。

(56) 接着分子がゼラチン、ラミニン、コラーゲンおよびフィブロネクチンからなる群から選ばれる少なくとも1種である、上記(53)記載の方法。

(57) ビタミンがレチノイン酸である、上記(53)記載の方法。

(58) 転写因子が、Nkx2)5/Csx、GATA4、MEF-2A、MEF-2B、MEF-2C、MEF-2D、

dHAND、eHAND、TEF-1、TEF-3、TEF-5 および MesP1 からなる群から選ばれる少なくとも1種である、上記(53)記載の方法。

(59) Nkx2)5/Csx が配列番号9で表されるアミノ酸配列、GATA4 が配列番号11で表されるアミノ酸配列、MEF-2A が配列番号13で表されるアミノ酸配列、MEF-2B が配列番号15で表されるアミノ酸配列、MEF-2C が配列番号17で表されるアミノ酸配列、MEF-2D が配列番号19で表されるアミノ酸配列、dHAND が配列番号21で表されるアミノ酸配列、eHAND が配列番号23で表されるアミノ酸配列、TEF-1 が配列番号25で表されるアミノ酸配列、TEF-3 が配列番号27で表されるアミノ酸配列、TEF-5 が配列番号29で表されるアミノ酸配列を有する、MesP1 が配列番号62で表されるアミノ酸配列をそれぞれ有する、上記(58)記載の方法。

(60) 細胞外基質が心筋細胞由来の細胞外基質であることを特徴とする上記(53)記載の方法。

(61) 核内受容体 PPAR- γ を活性化する因子を用いることを特徴とする、上記(1)～(28)のいずれか1項に記載の細胞から脂肪細胞を分化させる方法。

(62) 核内受容体 PPAR- γ の活性化因子がチアゾリジオン骨格を有する化合物であることを特徴とする上記(61)記載の方法。

(63) チアゾリジオン骨格を有する化合物がトログリタゾン、ピオグリタゾン、ロジグリタゾンからなる群から選ばれる少なくとも1種である、上記(62)記載の方法。

(64) 染色体 DNA の脱メチル化剤を有効成分として含有することを特徴とする心筋形成剤。

(65) 染色体 DNA の脱メチル化剤がデメチラーゼ、5-アザシチジンおよび DMSO からなる群から選ばれる少なくとも1種である、上記(64)記載の心筋形成剤。

(66) デメチラーゼが、配列番号1記載のアミノ酸配列で表されるデメチラーゼである、上記(65)記載の心筋形成剤。

(67) 胎児の心臓発生領域で発現している因子または胎児の心臓発生段階において心筋細胞への分化に働く因子を有効成分として含有する心筋形成剤。

(68) 胎児の心臓発生領域で発現している因子または胎児の心臓発生段階において心筋細胞への分化に働く因子が、サイトカイン、接着分子、ビタミン、転写因子および細胞外

基質からなる群から選ばれる少なくとも1種であることを特徴とする、上記(67)記載の心筋形成剤。

(69) サイトカインがPDGF、繊維芽細胞増殖因子8(FGF-8)、エンドセリン1(ET1)、ミドカイン(Midkine)、骨形成因子4(BMP-4)からなる群から選ばれる少なくとも1種である、上記(68)記載の心筋形成剤。

(70) PDGFが配列番号3または5記載のアミノ酸配列、FGF-8が配列番号64のアミノ酸配列、ET1が配列番号66で表されるアミノ酸配列、ミドカインが配列番号68で表されるアミノ酸配列、BMP-4が配列番号70で表されるアミノ酸配列をそれぞれ有する、上記(69)記載の心筋形成剤。

(71) 接着分子がゼラチン、ラミニン、コラーゲンおよびフィブロネクチンからなる群から選ばれる少なくとも1種である、上記(68)記載の心筋形成剤。

(72) ビタミンがレチノイン酸である、上記(71)記載の心筋形成剤。

(73) 転写因子が、Nkx2)5/Csx、GATA4、MEF-2A、MEF-2B、MEF-2C、MEF-2D、dHAND、eHAND、TEF-1、TEF-3、TEF-5 および MesP1 からなる群から選ばれる少なくとも1種である、上記(68)記載の心筋形成剤。

(74) Nkx2)5/Csxが配列番号9記載のアミノ酸配列で表される、GATA4が配列番号11記載のアミノ酸配列、MEF-2Aが配列番号13記載のアミノ酸配列、MEF-2Bが配列番号15記載のアミノ酸配列、MEF-2Cが配列番号17記載のアミノ酸配列、MEF-2Dが配列番号19記載のアミノ酸配列、dHANDが配列番号21記載のアミノ酸配列、eHANDが配列番号23記載のアミノ酸配列、TEF-1が配列番号25記載のアミノ酸配列、TEF-3が配列番号27記載のアミノ酸配列、TEF-5が配列番号29記載のアミノ酸配列、MesP1が配列番号62記載のアミノ酸配列でそれぞれ表される、上記(73)記載の心筋形成剤。

(75) 細胞外基質が心筋細胞由来の細胞外基質であることを特徴とする上記(68)記載の心筋形成剤。

(76) 上記(1)～(46)のいずれか1項に記載の細胞を用いることを特徴とする、心臓疾患により破壊された心臓を再生する方法。

(77) 上記(1)～(46)のいずれか1項に記載の細胞を有効成分とする心臓再生薬。

(78) 心臓の先天性遺伝子疾患での変異遺伝子に対する野生型遺伝子が導入された

上記(1)～(46)のいずれか1項に記載の細胞を用いることを特徴とする、先天性遺伝子疾患での変異遺伝子に対する野生型遺伝子を心筋へ特異的に輸送する方法。

(79) 心臓の先天性遺伝子疾患での変異遺伝子に対する野生型遺伝子が導入された上記(1)～(46)のいずれか1項に記載の細胞を有効成分として含有する心臓疾患治療薬。

(80) 上記(1)～(46)のいずれか1項に記載の細胞を免疫原として用いることを特徴とする、該細胞を特異的に認識する抗体を取得する方法。

(81) 上記(80)記載の方法で取得された抗体を用いることを特徴とする、上記(1)～(46)のいずれか1項に記載の心筋細胞への分化能を有する細胞を単離する方法。

(82) 上記(1)～(46)のいずれか1項に記載の細胞を用いることを特徴とする、該細胞に特異的な表面抗原を取得する方法。

(83) 上記(1)～(46)のいずれか1項に記載の細胞を用いることを特徴とする、該細胞を増殖する因子をスクリーニングする方法。

(84) 上記(1)～(46)のいずれか1項に記載の細胞を用いることを特徴とする、該細胞の心筋細胞への分化を誘導する因子をスクリーニングする方法。

(85) 上記(1)～(46)のいずれか1項に記載の細胞を用いることを特徴とする、該細胞を不死化する因子をスクリーニングする方法。

(86) 上記(1)～(46)のいずれか1項に記載の細胞にテロメラーゼを発現させることを特徴とする、該細胞の不死化方法。

(87) テロメラーゼが、配列番号31記載で表されるアミノ酸配列を有するテロメラーゼである上記(86)記載の方法。

(88) テロメラーゼを発現させることにより、不死化させた上記(1)～(46)のいずれか1項に記載の細胞を有効成分として含有する心臓疾患治療薬。

(89) テロメラーゼが、配列番号31記載で表されるアミノ酸配列を有するテロメラーゼである上記(88)記載の治療薬。

(90) 上記(1)～(46)のいずれか1項に記載の細胞を含んだ培養上清。

(91) 上記(90)記載の培養上清を用いることを特徴とする、上記(1)～(46)のいずれか1項に記載の細胞を心筋細胞に分化誘導する方法。

本発明の心筋細胞への分化能を有する細胞としては、骨髓、筋肉、脳、脾臓、肝臓、腎臓などの成体組織または臍帯血から単離することが可能であるが、好ましくは骨髓または臍帯血があげられる。

本発明の多分化能幹細胞としては、心筋細胞とそれ以外の細胞に分化する能力を有する細胞であればいかなる細胞でもよい。好ましくは少なくとも心筋細胞、血管内皮細胞に分化する能力を有する細胞、少なくとも心筋細胞、脂肪細胞、骨格筋細胞、骨芽細胞、血管内皮細胞に分化する能力を有する細胞、少なくとも心筋細胞、脂肪細胞、骨格筋細胞、血管内皮細胞、骨芽細胞、神経系細胞、肝細胞に分化する能力を有する細胞などがあげられる。

また、本来は脂肪細胞、骨格筋細胞、骨芽細胞に分化能を有する細胞であって、心筋細胞への分化する能力を有さない細胞であっても、後述する誘導方法等により心筋細胞へと分化する能力を付与される細胞であれば、本発明に包含される。

本発明の心筋細胞への分化能を有する細胞は、CD117 陽性および CD140 陽性である細胞があげられる。CD117 陽性および CD140 陽性である細胞としては、好ましくは CD34 陽性、CD117 陽性および CD140 陽性である細胞、CD34 陰性、CD117 陽性および CD140 陽性である細胞、より好ましくは CD144 陽性、CD34 陽性、CD117 陽性および CD140 陽性である細胞、CD144 陰性、CD34 陽性、CD117 陽性および CD140 陽性である細胞、CD144 陽性、CD34 陰性、CD117 陽性および CD140 陽性である細胞、CD144 陰性、CD34 陰性、CD117 陽性および CD140 陽性である細胞、さらに好ましくは CD 34陽性、CD 117陽性、CD 14陰性、CD 45陰性、CD 90陰性、Flk-1陰性、CD 31陰性、CD 105陰性、CD 144陽性、CD 140陽性、CD 49b陰性、CD 49d陰性、CD 29陽性、CD 54陰性、CD 102陰性、CD 106陰性および CD 44陽性である細胞、CD 34陽性、CD 117陽性、CD 14陰性、CD 45陰性、CD 90陰性、Flk-1陰性、CD 31陰性、CD 105陰性、CD 144陰性、CD 140陽性、CD 49b陰性、CD 49d陰性、CD 29陽性、CD 54陰性、CD 102陰性、CD 106陰性および CD 44陽性である細胞、CD 34陰性、CD 117陽性、CD 14陰性、CD 45陰性、CD 90陰性、Flk-1陰性、CD 31陰性、CD 105陰性、CD 144陽性、CD 140陽性、CD 49b陰性、CD 49d陰性、CD 29陽性、CD 54陰性、CD 102陰性、CD 106陰性および CD 44陽性である細胞、CD 34陰性、CD 117陽性、CD 14陰性、CD 45陰性、CD 90陰性、F

1k-1陰性、CD 31陰性、CD 105陰性、CD 144陰性、CD 140陽性、CD 49b陰性、CD 49d陰性、CD 29陽性、CD 54陰性、CD 102陰性、CD 106陰性および CD 44陽性である細胞があげられる。CD117 陽性および CD140 陽性である細胞としては、マウス骨髄由来多分化能間細胞である BMSC があげられる。マウス骨髄由来多分化能幹細胞 BMSC は、平成12年2月22日付けで通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所(日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号)に FERM BP-7043 として寄託されている。

本来は脂肪細胞、骨格筋細胞、骨芽細胞に分化能を有する細胞であって、心筋細胞への分化する能力を有さない細胞であっても、後述する誘導方法等により心筋細胞へと分化する能力を付与される細胞としては、CD117 陰性および CD140 陽性である細胞、好ましくは CD144 陰性、CD34 陰性、CD117 陰性および CD140 陽性である細胞、より好ましくは、CD34 陰性、CD117 陰性、CD14 陽性、CD45 陰性、CD90 陰性、Flk-1 陰性、CD31 陰性、CD105 陰性、CD144 陰性、CD140 陽性、CD49b 陽性、CD49d 陰性、CD29 陽性、CD54 陽性、CD102 陰性、CD106 陽性および CD44 陽性である細胞があげられる。CD34 陰性、CD117 陰性、CD14 陽性、CD45 陰性、CD90 陰性、Flk-1 陰性、CD31 陰性、CD105 陰性、CD144 陰性、CD140 陽性、CD49b 陽性、CD49d 陰性、CD29 陽性、CD54 陽性、CD102 陰性、CD106 陽性および CD44 陽性である細胞としては、KUM2 細胞があげられる。

本発明で使用される成体組織または臍帯血の種としては、脊椎動物、好ましくは温血動物、特に好ましくはマウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギ、ネコ、イヌ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ヤギ、サル、ヒトなどの哺乳動物などが用いられる。ヒトの治療用途にはヒト由来であることが好ましい。

上記動物から、成体組織または臍帯血から心筋細胞への分化能を有する細胞を単離し、培養した後に、心筋細胞への分化能を有する細胞を分化、誘導することにより、心筋細胞を得ることができる。

また、本発明の多分化能幹細胞を用いて、心筋細胞だけでなく、血管内皮細胞、平滑筋、骨格筋細胞、脂肪細胞、骨、軟骨、膵内分泌系細胞、膵外分泌系細胞、肝細胞、腎糸球体細胞、腎尿細管細胞、ニューロン、グリア、オリゴデンドロサイトなどへの分化を誘導することにより、各種細胞を得ることができる。

以下、本発明を詳細に説明する。

1. 心筋細胞への分化能を有する細胞の単離

本発明の心筋細胞への分化能を有する細胞は、成体組織または臍帯血など心筋細胞への分化能を有する細胞を取得することが可能な組織であればいかなる組織からでも単離することができる。以下に、骨髓から心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞を単離する方法を述べる。

(1) 骨髓から心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞を単離する方法

ヒトの骨髓より心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞を取得する方法としては、安全かつ効率的に取得される方法であれば特に限定されないが、S. E. Haynesworth et al. Bone, 13, 81 (1992)に記載された方法に基づき行うことができる。

胸骨または腸骨から骨髓穿刺を行う。骨髓穿刺を行う場所の皮膚面を消毒し、局所麻酔を行う。特に骨膜下を十分に麻酔する。骨髓穿刺針の内筒を抜き、5000units のヘパリンを入れた 10ml 注射器を装着して必要量の骨髓液を速やかに吸引する。平均的には 10ml～20ml の骨髓液を吸引する。骨髓穿刺針を取り外し、10 分間程圧迫止血する。取得した骨髓液を $1,000 \times g$ の遠心分離により骨髓細胞を回収した後、該骨髓細胞を PBS (Phosphate Buffered Saline) で洗浄する。本ステップを2回繰り返した後、該骨髓細胞を 10% の FBS (牛胎仔血清) を含む α -MEM (α -modified MEM)、DMEM (Dulbecco's modified MEM)あるいは IMDM (Isocove's modified Dulbecco's medium)等の細胞培養用培地に再浮遊させることにより骨髓細胞液を得ることができる。

該骨髓細胞液から心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞を単離する方法としては、溶液中に混在する他の細胞、例えば血球系細胞、造血幹細胞、血管幹細胞および線維芽細胞などを除去できれば特に限定されないが、M. F. Pittenger et al. Science, 284, 143 (1999)に記載された方法に基づき骨髓細胞液を密度 1.073g/ml の percoll に重層した後、 $1,100 \times g$ で 30 分間遠心分離して界面の細胞を回収することにより単離することができる。また、該骨髓細胞液に 10×PBS を加えて 9/10 に希釈した percoll を同容量加えて混合した後、 $20,000 \times g$ で 30 分間遠心分離し、密度 1.075～1.060 の画分を回収することにより、該心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞を含む骨髓細胞混合物を取得することができる。

上記方法により取得した該心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞を含む骨髓細胞混

合物は、96 穴の培養プレート各穴に 1 細胞のみが注入されるように希釈して、1 細胞由来のクローンを多数調製した後、以下に記載した心筋細胞への分化能を有する骨髄細胞から心筋細胞を誘導する方法を用いて該クローンを処理し、自律拍動する細胞が出現するクローンを選択することにより、該心筋細胞への分化能を有する骨髄細胞を得ることができる。

ラットやマウスから心筋細胞への分化能を有する骨髄細胞を取得する方法としては、特に限定されないが以下の手順で取得することができる。ラットあるいはマウスを頸椎脱臼により致死させ、70%エタノールで充分消毒した後、大腿骨の皮膚ならびに大腿四頭筋を切除する。膝関節の部分にハサミをいれて関節をはずし、大腿骨背面の筋肉を除去する。股関節の部分にハサミを入れて関節を外し、大腿骨を取り出す。大腿骨に付着している筋肉をハサミでできるだけ除去した後、大腿骨の両端をハサミで切断する。骨の太さに応じた適当なサイズの針を 2.5ml の注射器に装着し、10%の FBS (牛胎仔血清) を含む α -MEM、DMEM、あるいは IMDM 等の細胞培養用培地約 1.5ml を注射器に充填した後、注射針の先端を大腿骨の膝関節側の断端に差し込む。注射器内の培養液を骨髓内に注入することで、股関節側の断端から骨髓細胞が押し出される。得られた骨髓細胞はビペッティングにより培養液中に浮遊させる。該骨髓液からは、上記のヒト骨髓液からの骨髓細胞の単離と同様の方法により、心筋細胞への分化能を有する骨髄細胞を単離することができる。

(2) 骨髄以外の組織から心筋細胞への分化能を有する細胞を単離する方法

後述する 12 に記載の抗体を用いた分離方法により、心筋細胞への分化能を有する細胞を、骨髄以外の組織からも取得することができる。

骨髄以外の組織としては、好ましくは臍帯血があげられる。具体的には、以下の方法で行うことができる。

まず臍帯から臍帯血を分取し、ただちに 500units/ml の終濃度になるようにヘパリンを加える。よく混合した後、遠心分離して臍帯血から細胞を分取し、10%の FBS (牛胎仔血清) を含む α -MEM (α -modified MEM)、DMEM (Dulbecco's modified MEM) あるいは IMDM (Isocove's modified Dulbecco's medium) 等の細胞培養用培地に再浮遊させる。得られた細胞液から後述する抗体を利用して、心筋細胞への分化能を有する細胞を分離することができる。

2. 心筋細胞への分化能を有する細胞の培養

上記1の方法により単離した、心筋細胞への分化能を有する細胞を培養するために用いる培地としては、通常公知(組織培養の技術基礎編 第三版、朝倉書店 1996)の組成の細胞培養用培地を用いることができるが、好ましくは牛等の血清を5~20%添加した、 α -MEM、DMEMあるいはIMDM等の細胞培養用培地などが用いられる。培養条件は、細胞が培養可能であればいかなる条件でもよいが、培養温度は33~37°Cが好ましく、さらに5~10%の二酸化炭素ガスで満たした孵卵器で培養することが好ましい。心筋細胞への分化能を有する骨髄細胞は、通常の組織培養用のプラスチック製培養皿に接着して増殖することが好ましい。細胞が培養皿一面に増殖する頃、培地を除去して、トリプシン EDTA 溶液を加えることで細胞を浮遊させる。浮遊した細胞は、PBSあるいは該細胞培養用の培地で洗浄後、該細胞培養用の培地で5倍から20倍希釈して新しい培養皿に添加することで、さらに継代培養することができる。

3. 心筋細胞への分化能を有する細胞からの心筋細胞の誘導方法

心筋細胞への分化能を有する細胞より心筋細胞を誘導する方法としては、(1)DNAの脱メチル化剤処理による分化誘導、(2)胎児の心臓発生領域で発現している因子または胎児の心臓発生段階において心筋細胞への分化に働く因子による分化誘導、(3)心筋細胞への分化能を有する細胞または該細胞から分化した心筋細胞の培養上清による分化誘導などの方法を挙げることができる。これらの方法を単独あるいは組み合わせることにより、心筋細胞への分化能を有する細胞から心筋細胞を誘導することができる。また、本来、心筋細胞への分化能を有していない間葉系細胞も、これらの方法を用いることにより、心筋細胞への分化能を有する細胞へと分化し、心筋細胞を誘導することができる。

DNAの脱メチル化剤としては、DNAに対して脱メチル化を引き起こす化合物であればいかなるものでもよい。DNAの脱メチル化剤としては、染色体DNA中のGpC配列中のシトシン残基のメチル化を特異的に阻害する酵素であるデメチラーゼ、5-アザシチジン(以下5-aza-Cと略す)、DMSO(dimethyl sulfoxide)などがあげられる。デメチラーゼとしては、配列番号1記載のアミノ酸配列を有するデメチラーゼ[Nature, 397, 579-583 (1999)]などがあげられる。DNAの脱メチル化剤処理による分化誘導の具体例を以下に示す。

3 μ mol/lから10 μ mol/lの間の濃度になるように5-aza-Cを心筋細胞への分化能を有

する細胞を含む培地中に添加し、24時間上記培養条件下でインキュベーションする。培地を交換することで5-aza-Cを除去し、さらに2～3週間培養することで心筋細胞を取得することができる。形成される心筋細胞は培養2～3週間目では洞結節細胞が中心であるが、培養4週間目以降心室型心筋細胞を分化誘導することができる。

胎児の心臓発生領域で発現している因子または胎児の心臓発生段階において心筋細胞への分化に働く因子としては、サイトカイン、ビタミン、接着分子、転写因子などをあげることができる。

サイトカインとしては、心筋細胞への分化能を有する細胞に、心臓の発生段階で心筋細胞への分化を促進するものであればいかなるサイトカインでもよい。

具体的には、血小板由来増殖因子(以下、PDGFと略記する。)、線維芽細胞増殖因子8(FGF8)、エンドセリン1(ET1)、ミドカイン(midkine)、骨形成因子4(BMP4)などをあげることができる。PDGFとしてはPDGF A、PDGF B、PDGF Cなどがあげられ、具体的には配列番号3または5のアミノ酸配列で表されるものが、線維芽細胞増殖因子8(FGF8)としては配列番号64のアミノ酸配列で表されるものが、エンドセリン1(ET1)としては配列番号66のアミノ酸配列で表されるものが、ミドカイン(midkine)としては配列番号68のアミノ酸配列で表されるものが、骨形成因子4(BMP4)としては配列番号70のアミノ酸配列で表されるものが好ましく用いられる。サイトカインは、例えば10～40ng/mlの濃度で用いられる。

また、心筋細胞への分化を抑制するサイトカインに対する阻害剤を用いることにより、心筋細胞への分化能を有する細胞に、心臓の発生段階で心筋細胞への分化を促進することも可能である。

心筋細胞への分化を抑制するサイトカインとしては、線維芽細胞増殖因子-2(以下、FGF-2と略記する。)、具体的には、配列番号7または8で表されるFGF-2などをあげることができる。

心筋細胞への分化を抑制するサイトカインに対する阻害剤としては、サイトカインの情報伝達を阻害する物質、例えばサイトカインを中和する抗体、低分子化合物などをあげることができる。

ビタミンとしては、レチノイン酸など心筋細胞への分化能を有する細胞に、心臓の発生段階で心筋細胞への分化を促進するものであればいかなるビタミンでもよい。レチノイン酸は、

例えば、 10^{-9} M の濃度で用いられる。

接着分子としては、心臓の発生段階で心臓発生領域で発現していればいかなる接着分子でもよい。具体的には、ゼラチン、ラミニン、コラーゲン、フィブロネクチンなどの細胞外マトリックス蛋白質等があげられる。例えば、フィブロネクチンをコートした培養皿で該心筋細胞への分化能を有する細胞を培養することにより心筋細胞への分化を促進することができる。

転写因子としては、ホモオボックス型転写因子 Nkx2.5/Csx (配列番号 9: アミノ酸配列、配列番号 10: 塩基配列)、GATA ファミリーに属する Zinc finger 型転写因子 GATA4 (配列番号 11: アミノ酸配列、配列番号 12: 塩基配列)、myocyte enhancer factor-2 (MEF-2) ファミリーに属する転写因子 MEF-2A (配列番号 13: アミノ酸配列、配列番号 14: 塩基配列)、MEF-2B (配列番号 15: アミノ酸配列、配列番号 16: 塩基配列)、MEF-2C (配列番号 17: アミノ酸配列、配列番号 18: 塩基配列) と MEF-2D (配列番号 19: アミノ酸配列、配列番号 20: 塩基配列)、basic helix loop helix 型転写因子に属する dHAND (配列番号 21: アミノ酸配列、配列番号 22: 塩基配列)、eHAND (配列番号 23: アミノ酸配列、配列番号 24: 塩基配列) と MesP1 (配列番号 61: アミノ酸配列、配列番号 62: 塩基配列)、TBA-DNA 結合型転写因子ファミリーに属する TEF-1 (配列番号 25: アミノ酸配列、配列番号 26: 塩基配列)、TEF-3 (配列番号 27: アミノ酸配列、配列番号 28: 塩基配列) と TEF-5 (配列番号 29: アミノ酸配列、配列番号 30: 塩基配列) などをあげることができる。

上述した転写因子は、該因子をコードする DNA を心筋細胞への分化能を有する細胞中に導入し、DNA を発現させることにより心筋細胞への分化を誘導させることができる。

また、自律拍動する心筋細胞から取得した細胞外基質をコートした培養皿を用いて培養すること、自律拍動する心筋細胞と共培養すること、自律拍動する心筋細胞の培養上清を添加することで、心筋細胞への分化能を有する細胞を心筋細胞へ分化誘導させることができる。

また、4に示す方法で得られる心筋細胞への分化を誘導する因子(以下、心筋分化誘導因子と称する)を用いても、心筋細胞への分化能を有する細胞を心筋細胞に分化誘導することができる。

4. 心筋分化誘導因子の取得

心筋分化誘導因子の取得方法としては、自律拍動する細胞の培養上清に各種プロテアーゼ阻害剤を添加して、透析、塩析ならびにクロマトグラフィーなどを組み合わせることにより取得することができる。

さらにマイクロシーケンサーを用いて、上記の心筋分化誘導因子の部分アミノ酸配列を決定し、該アミノ酸配列に基づき設計した DNA プローブを用いて該自律拍動する細胞より作製した cDNA ライブラリーをスクリーニングすることにより、心筋分化誘導因子の遺伝子を取得することができる。

5. 心筋細胞への分化能を有する細胞を含む心臓再生薬または心臓疾患治療薬

本発明の心筋細胞への分化能を有する細胞は、心臓再生薬または心臓疾患治療薬として用いることができる。

心臓疾患としては、心筋梗塞、虚血性心疾患、うっ血性心不全、不整脈、肥大型心筋症、拡張型心筋症、心筋炎、弁膜症などをあげることができる。

心臓再生薬としては、心筋細胞への分化能を有する細胞を高純度で含み、心臓の障害部位ならび大きさに応じて、該心筋細胞への分化能を有する細胞を増殖させたもの、好ましくは、心筋細胞への分化能を有する細胞から、心筋内皮細胞(Endocardial endothelial cell)、クッション細胞(Cushion cell)、心室型心筋細胞、心房型心筋細胞、洞結節細胞等の心臓を形成する様々な細胞へ分化誘導できる細胞が用いられる。

これらの薬剤は、心筋梗塞の患者骨髓液中から上述した密度勾配遠心分離法、後述する心筋細胞への分化能を有する細胞を特異的に認識する抗体を用いたパニング法[*Immunol.*, 141(8), 2797-2800 (1988)]あるいは FACS 法[*Int. Immunol.*, 10(3), 275-283 (1998)]、または心筋細胞への分化能を有する細胞に特異的な遺伝子のプロモーターを用いたレポーター系を構築する方法により該心筋細胞への分化能を有する細胞の精製を行うことにより、製造することができる。

また該薬剤には、後述する心筋形成剤を用いて、該心筋細胞への分化能を有する細胞を心筋細胞へ分化誘導させた細胞、高齢者の骨髓から取得した骨髓細胞より、後述する不死化方法を利用して細胞分裂能を賦活させた心筋細胞への分化能を有する細胞も含まれる。

上記方法で製造した治療薬は、上記心筋細胞への分化能を有する細胞を特異的に認識

する抗体とFACS法を組み合わせることで純度を検定することができる。

上記の治療薬を障害部位に輸送する方法としては、カテーテルを利用する方法等が用いられる。以下虚血性心疾患を例に具体的な方法を示す。虚血性心疾患で障害を受けた心筋細胞は、血管狭窄部位の下流に存在することから、上記の細胞を注入する前に、冠動脈造影法(図説病態内科講座 循環器—1、MEDICAL VIEW,1993)により血管の狭窄部位を同定しておく必要がある。器質的狭窄病変は狭窄病態に応じて求心性狭窄、偏心性狭窄、多発性壁不整に分類され、特に偏心性狭窄はタイプIおよびタイプIIの2つのタイプに細分類される。狭窄形態は狭心症の経過、予後に関連することが知られており、タイプIIの偏心性狭窄や多発性壁不整は不安定狭心症例に多く、心筋梗塞に移行する可能性が高い。血管が完全に狭窄している場合には、注入する細胞が障害部位に到達しない可能性があるため、事前に経皮的冠動脈形成術(PTCA)あるいは血栓溶解療法などにより狭窄部位を再開することが必要である。障害を受けた心筋細胞の部位に応じて、注入する細胞を心室型や心房型のように区別することができる。カテーテルの挿入法は右上腕動脈より挿入するSones法(図説病態内科講座 循環器—1、MEDICAL VIEW,1993)あるいは大腿動脈より挿入するJundkins法(図説病態内科講座 循環器—1、MEDICAL VIEW,1993)を利用することができる。

6. 心筋形成剤

本発明の心筋形成剤は、染色体DNAの脱メチル化剤、胎児の心臓発生領域で発現している因子、あるいは胎児の心臓発生段階で心筋細胞への分化に働く因子、心筋分化誘導因子の少なくとも一種類を有効成分として含有し、心筋細胞への分化能を有する細胞を心筋細胞へ分化誘導させることができる。

当該心筋形成剤としては、サイトカイン、ビタミン、接着分子、転写因子などをあげることができる。

サイトカインとしては、心筋細胞への分化能を有する細胞に、心臓発生段階で心筋細胞への分化を促進するものであればいかなるサイトカインでもよい。

具体的には、PDGF、線維芽細胞増殖因子8(FGF8)、エンドセリン1(ET1)、ミドカイン(midkine)、骨形成因子4(BMP4)などをあげることができる。PDGFとしては配列番号3または5のアミノ酸配列で表されるものが、線維芽細胞増殖因子8(FGF8)としては配列番号64の

アミノ酸配列で表されるものが、エンドセリン1(ET1)としては配列番号66のアミノ酸配列で表されるものが、ミドカイン(Midkine)としては配列番号68のアミノ酸配列で表されるものが、骨形成因子4(BMP4)としては配列番号70のアミノ酸配列で表されるものが好ましく用いられる。サイトカインは、例えば10~40ng/mlの濃度で用いられる。

ビタミンとしては、レチノイン酸など心筋細胞への分化能を有する細胞に、心臓発生段階で心筋細胞への分化を促進するものであればいかなるビタミンでもよい。レチノイン酸は、例えば 10^{-9} Mの濃度で用いられる。

接着分子としては、心臓発生段階で心臓発生領域で発現していればいかなる接着分子でもよい。具体的には、ゼラチン、ラミニン、コラーゲン、フィブロネクチン等があげられる。例えば、フィブロネクチンをコートした培養皿で該心筋細胞への分化能を有する細胞を培養することにより心筋細胞への分化を促進することができる。

転写因子としては、ホメオボックス型転写因子 Nkx2.5/Csx (配列番号 9:アミノ酸配列、配列番号 10:塩基配列)、GATA ファミリーに属する Zinc finger 型転写因子 GATA4 (配列番号 11:アミノ酸配列、配列番号 12:塩基配列)、myocyte enhancer factor-2(MEF-2)ファミリーに属する転写因子 MEF-2A (配列番号 13:アミノ酸配列、配列番号 14:塩基配列)、MEF-2B (配列番号 15:アミノ酸配列、配列番号 16:塩基配列)、MEF-2C (配列番号 17:アミノ酸配列、配列番号 18:塩基配列)と MEF-2D (配列番号 19:アミノ酸配列、配列番号 20:塩基配列)、basic helix loop helix 型転写因子に属する dHAND (配列番号 21:アミノ酸配列、配列番号 22:塩基配列)、eHAND (配列番号 23:アミノ酸配列、配列番号 24:塩基配列)と MesP1 (配列番号 61:アミノ酸配列、配列番号 62:塩基配列)、TEA-DNA 結合型転写因子ファミリーに属する TEF-1 (配列番号 25:アミノ酸配列、配列番号 26:塩基配列)、TEF-3 (配列番号 27:アミノ酸配列、配列番号 28:塩基配列)と TEF-5 (配列番号 29:アミノ酸配列、配列番号 30:塩基配列)などをあげることができる。

該心筋形成剤には心筋分化誘導因子の遺伝子を有効成分として含むものと、心筋分化誘導因子の本体である蛋白質を有効成分として含むものがある。

(1) 心筋分化誘導因子をコードする遺伝子を有効成分とする心筋形成剤

以下に本発明の心筋形成剤が心筋分化誘導因子をコードする遺伝子を有効成分とする場合の調製法について述べる。

まず、心筋分化誘導因子の遺伝子 DNA 断片、あるいは全長 cDNA をウイルスベクタープラスミド内のプロモーターの下流に挿入することにより、組換えウイルスベクタープラスミドを造成する。

該組換えウイルスベクタープラスミドを、該ウイルスベクタープラスミドに適合したパッケージング細胞に導入する。

パッケージング細胞としては、ウイルスのパッケージングに必要なタンパク質をコードする遺伝子の少なくとも1つを欠損している組換えウイルスベクタープラスミドの該欠損する蛋白質を補給できる細胞であればいかなるものも用いることができる。例えばヒト腎臓由来の HEK293 細胞、マウス線維芽細胞 NIH3T3 などを用いることができる。

パッケージング細胞で補給する蛋白質としては、レトロウイルスベクターの場合はマウスレトロウイルス由来の gag、pol、env などの蛋白質、レンチウイルスベクターの場合は HIV ウイルス由来の gag、pol、env、vpr、vpu、vif、tat、rev、nef などの蛋白質、アデノウイルスベクターの場合はアデノウイルス由来の E1A、E1B などの蛋白質、アデノ随伴ウイルスの場合は Rop(p5,p19,p40)、Vp(Cap)などの蛋白質を用いることができる。

ウイルスベクタープラスミドとしては上記パッケージング細胞において組換えウイルスが生産でき、心臓先天性遺伝子疾患の原因遺伝子に対する野生型の遺伝子を心筋細胞で転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。

ウイルスベクタープラスミドとしては MFG [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 6733-6737 (1995)], pBabePuro [Nucleic Acids Research, 18, 3587-3596 (1990)], LL-CG、CL-CG、CS-CG、CLG [Journal of Virology, 72, 8150-8157 (1998)], pAdex1 [Nucleic Acids Res., 23, 3816-3821 (1995)]等が用いられる。

プロモーターとしては、ヒト組織中で発現できるものであればいずれも用いることができ、例えば、サイトメガロウイルス(ヒトCMV)のIE(immediate early)遺伝子のプロモーター、SV40の初期プロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショック蛋白質プロモーター、SR α プロモーター等をあげることができる。また、ヒトCMVのIE遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。また、Nkx2.5/Csx 遺伝子のような心筋細胞特異的な遺伝子のプロモーターを用いることで、心筋細胞で特異的に目的の遺伝子を発現させることができる。

上記組換えウイルスベクタープラスミドを上記パッケージング細胞に導入することで組換えウイルスベクターを生産することができる。上記パッケージング細胞への上記ウイルスベクタープラスミドの導入法としては、例えば、リン酸カルシウム法[特開平 2-227075]、リポフエクション法[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)]等をあげることができる。

上述した組換えウイルスベクターは、遺伝子治療剤に用いる基剤と共に調合して心筋形成剤を製造することができる[Nature Genet., 8, 42 (1994)]。遺伝子治療剤に用いる基剤としては、通常注射剤に用いる基剤であればいかなるものでも用いることができる。例えば、蒸留水、塩化ナトリウム又は塩化ナトリウムと無機塩との混合物等の塩溶液、マンニトール、ラクトース、デキストラン、グルコース等の溶液、グリシン、アルギニン等のアミノ酸溶液、有機酸溶液又は塩溶液とグルコース溶液との混合溶液等があげられる。また常法に従い、これらの基剤に浸透圧調整剤、pH 調整剤、ゴマ油、ダイズ油等の植物油又はレシチンもしくは非イオン界面活性剤等の界面活性剤等の助剤を用いて、溶液、懸濁液、分散液として注射剤を調製してもよい。これらの注射剤を、粉末化、凍結乾燥等の操作により用時溶解用製剤として調製することもできる。上記の心筋形成剤は、液体の場合はそのまま、固体の場合は治療の直前に必要により滅菌処理をした上記の基剤に溶解して遺伝子治療に使用することができる。本発明の心筋形成剤の投与方法は、患者の治療部位の心筋に吸収されるように、カテーテル等を用いて局所的に投与方法等が用いられる。

上述した組換えウイルスベクターは試験管内で該心筋細胞への分化能を有する細胞に感染させた後、上述した心筋形成剤として調製し、患者に投与することができる。または、組換えウイルスベクターを患者の患部に直接投与することもできる。

(2) 蛋白質を有効成分とする心筋形成剤

以下に本発明の心筋形成剤が心筋分化誘導因子蛋白質を有効成分とする場合の調製法について述べる。

心筋分化誘導因子蛋白質の完全長 cDNA をもとに、必要に応じて、該蛋白質をコードする部分を含む適当な長さの DNA 断片を調製する。

該 DNA 断片、あるいは完全長 cDNA を発現ベクター内のプロモーターの下流に挿入することにより、該蛋白質の組換え発現ベクターを造成する。

該組換え発現ベクターを、該発現ベクターに適合した宿主細胞内に導入する。

宿主細胞としては、目的とする DNA を発現できるものは全て用いることができ、例えば、エシェリヒア (*Escherichia*) 属、セラチア (*Serratia*) 属、コリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 属、ブレヴィバクテリウム (*Brevibacterium*) 属、シュードモナス (*Pseudomonas*) 属、バチルス (*Bacillus*) 属、ミクロバクテリウム (*Microbacterium*) 属等に属する細菌、クルイペロミセス (*Kluyveromyces*) 属、サッカロマイセス (*Saccharomyces*) 属、シゾサッカロマイセス (*Shizosaccharomyces*) 属、トリコスポロン (*Trichosporon*) 属、シワニオミセス (*Schwanniomyces*) 属等に属する酵母や動物細胞、昆虫細胞等を用いることができる。

発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製可能ないしは染色体中への組み込みが可能で、心筋分化誘導因子蛋白質の遺伝子 DNA を転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。

細菌を宿主細胞として用いる場合は、心筋分化誘導因子蛋白質の組換え発現ベクターは該細菌中で自立複製可能であると同時に、プロモーター、リボソーム結合配列、心筋分化誘導因子蛋白質をコードする DNA および転写終結配列より構成された組換え発現ベクターであることが好ましい。プロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。

発現ベクターとしては、例えば、pBTrp2、pBTac1、pBTac2 (いずれもベーリングーマンハイム社より市販)、pKK233-2 (Amersham Pharmacia Biotech 社製)、pSE280 (Invitrogen 社製)、pGEMEX-1 (Promega 社製)、pQE-8 (QIAGEN 社製)、pKYP10 [特開昭 58-110600]、pKYP200 [Agricultural Biological Chemistry, 48, 669 (1984)]、pLSA1 [Agric. Biol. Chem., 53, 277 (1989)]、pGEL1 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 4306 (1985)]、pBluescript II SK(-) (Stratagene 社製)、pGEX (Amersham Pharmacia Biotech 社製)、pET-3 (Novagen 社製)、pTerm2 (USP4686191, USP4939094, USP5160735)、pSupex、pUB110、pTP5、pC194、pEG400 [J. Bacteriol., 172, 2392 (1990)] 等を例示することができる。

発現ベクターとしては、リボソーム結合配列であるシャイン・ダルガノ (Shine-Dalgarno) 配列と開始コドンとの間を適当な距離 (例えば 6~18 塩基) に調節したものを用いることが好ましい。

プロモーターとしては、宿主細胞中で発現できるものであればいかなるものでもよい。例えば、trp プロモーター (P_{trp})、lac プロモーター (P_{lac})、P_L プロモーター、P_R プロモーター、T7 プロモーター等の大腸菌やファージ等に由来するプロモーター、SPO1 プロモーター、

SPO2 プロモーター、penP プロモーター等をあげることができる。またP trpを2つ直列させたプロモーター (P trp x2)、tac プロモーター、letI プロモーター[Gene, 44, 29 (1986)]、lacT7 プロモーターのように人為的に設計改変されたプロモーター等も用いることができる。

本発明の心筋分化誘導因子蛋白質の遺伝子 DNA の蛋白質をコードする部分の塩基配列を、宿主の発現に最適なコドンとなるように、塩基を置換することにより、目的とする蛋白質の生産率を向上させることができる。

本発明の心筋分化誘導因子蛋白質の遺伝子 DNA の発現には転写終結配列は必ずしも必要ではないが、好適には構造遺伝子直下に転写終結配列を配置することが望ましい。

宿主細胞としては、エシェリヒア属、セラチア属、コリネバクテリウム属、ブレヴィバクテリウム属、シュードモナス属、バチルス属、ミクロバクテリウム属等に属する微生物、例えば、Escherichia coli XL1-Blue、Escherichia coli XL2-Blue、Escherichia coli DH1、Escherichia coli MC1000、Escherichia coli KY3276、Escherichia coli W1485、Escherichia coli JM109、Escherichia coli HB101、Escherichia coli No.49、Escherichia coli W3110、Escherichia coli NY49、Bacillus subtilis、Bacillus amyloliquefaciens、Brevibacterium ammoniagenes、Brevibacterium immariophilum ATCC14068、Brevibacterium saccharolyticum ATCC14066、Corynebacterium glutamicum ATCC13032、Corynebacterium glutamicum ATCC14067、Corynebacterium glutamicum ATCC13869、Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870、Microbacterium ammoniaphilum ATCC15354、Pseudomonas sp. D-0110 等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、上記宿主細胞へ DNA を導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、カルシウムイオンを用いる方法[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110 (1972)]、プロトプラスト法(特開昭 63-248394)、または Gene, 17, 107 (1982) や Molecular & General Genetics, 168, 111 (1979)に記載の方法等をあげることができる。

酵母を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、YEp13 (ATCC37115)、YEp24 (ATCC37051)、YCp50 (ATCC37419)、pHS19、pHS15 等を例示することができる。

プロモーターとしては、酵母中で発現できるものであればいかなるものでもよく、例えば、PHO5 プロモーター、PGK プロモーター、GAP プロモーター、ADH プロモーター、gal 1 プ

ロモーター、gal 10 プロモーター、ヒートショック蛋白質プロモーター、MF α 1 プロモーター、CUP 1 プロモーター等をあげることができる。

宿主細胞としては、サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、シズサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*)、クリュイベロミセス・ラクチス (*Kluyveromyces lactis*)、トリコスポロン・プルランス (*Trichosporon pullulans*)、シュワニオミセス・アルビウス (*Schwanniomyces alluvius*) 等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、酵母に DNA を導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [Methods in Enzymol., 194, 182 (1990)]、スフェロプラスト法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929 (1978)]、酢酸リチウム法 [J. Bacteriol., 153, 163 (1983)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929 (1978)] 等をあげることができる。

動物細胞を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、pCDNAI (Invitrogen 社製)、pCDM8 (Invitrogen 社製)、pAGE107 [特開平 3-22979; Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、pAS3-3 (特開平 2-227075)、pCDM8 [Nature, 329, 840 (1987)]、pCDNAI/Amp (Invitrogen 社製)、pREP4 (Invitrogen 社製)、pAGE103 [J. Biochem., 101, 1307 (1987)]、pAGE210 等を例示することができる。

プロモーターとしては、動物細胞中で発現できるものであればいずれも用いることができ、例えば、サイトメガロウイルス (ヒト CMV) の IE (immediate early) 遺伝子のプロモーター、SV40 の初期プロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショック蛋白質プロモーター、SR α プロモーター等をあげることができる。また、ヒト CMV の IE 遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。

宿主細胞としては、ヒトの細胞であるナマルバ (Namalwa) 細胞、サルの細胞である COS 細胞、チャイニーズ・ハムスターの細胞である CHO 細胞、HBT5637 [特開昭 63-299] 等をあげることができる。

組換えベクターの導入法としては、動物細胞に DNA を導入できるいかなる方法も用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、リン酸カルシウム法 (特開平 2-227075)、リポフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 84, 7413 (1987)、Virology, 52, 456 (1973)] 等を用いることができる。形質転換体の取得および培養

は、特開平 2-227075 号公報あるいは特開平 2-257891 号公報に記載されている方法に準じて行なうことができる。

昆虫細胞を宿主として用いる場合には、例えばバキュロウイルス・エクスプレッション・ベクターズ、ア・ラボラトリー・マニュアル[Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W.H. Freeman and Company, New York (1992)]、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー サプリメント 1-38(1987-1997)、Bio/Technology, 6, 47 (1988)等に記載された方法によって、蛋白質を発現することができる。

即ち、組換え遺伝子導入ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得た後、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、蛋白質を発現させることができる。

該方法において用いられる遺伝子導入ベクターとしては、例えば、pVL1392、pVL1393、pBlueBacIII(ともに Invitrogen 社製)等をあげることができる。

バキュロウイルスとしては、例えば、夜盗蛾科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラフア・カリフォルニカ・ヌクレアー・ポリヘドロシス・ウイルス(Autographa californica nuclear polyhedrosis virus)等を用いることができる。

昆虫細胞としては、Spodoptera frugiperda の卵巣細胞である Sf9、Sf21[Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W.H.Freeman and Company, New York, (1992)]、Trichoplusia ni の卵巣細胞である High 5 (Invitrogen 社製)等を用いることができる。

組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への上記組換え遺伝子導入ベクターと上記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法[特開平 2-227075]、リポフェクション法[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)]等をあげることができる。

遺伝子の発現方法としては、直接発現以外に、モレキュラー・クローニング 第2版[Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)]に記載されている方法等に準じて、分泌生産、融合蛋白質発現等を行うことができる。

酵母、動物細胞または昆虫細胞により発現させた場合には、糖あるいは糖鎖が付加された蛋白質を得ることができる。

心筋分化誘導因子をコードする DNA を組み込んだ組換え体 DNA を保有する形質転換体を培地に培養し、培養物中に心筋分化誘導因子蛋白質を生成蓄積させ、該培養物より該蛋白質を採取することにより、心筋分化誘導因子蛋白質を製造することができる。

心筋分化誘導因子蛋白質を製造する形質転換体を培地に培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。

大腸菌等の原核生物あるいは酵母等の真核生物を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、該宿主が資化し得る炭素源、窒素源、無機物等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれでもよい。

炭素源としては、それぞれの宿主が資化し得るものであればよく、グルコース、フラクトース、スクロース、これらを含有する糖蜜、デンプンあるいはデンプン加水分解物等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノールなどのアルコール類を用いることができる。

窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の各種無機酸若しくは有機酸のアンモニウム塩、その他含窒素化合物、並びに、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンスチープリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕および大豆粕加水分解物、各種発酵菌体およびその消化物等が用いられる。

無機物としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等を用いることができる。

培養は、振盪培養または深部通気攪拌培養などの好氣的条件下で行う。培養温度は 15～40℃がよく、培養時間は、通常 16 時間～7 日間である。培養中 pH は、3.0～9.0 に保持する。pH の調整は、無機あるいは有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニアなどを用いて行う。

また培養中必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、lac プロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピル

— β —D—チオガラクトピラノシド (IPTG) 等を、trp プロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸 (IAA) 等を培地に添加してもよい。

動物細胞を宿主細胞として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されている RPMI1640 培地 [The Journal of the American Medical Association, 199, 519 (1967)]、Eagle の MEM 培地 [Science, 122, 501 (1952)]、ダルベッコ改変 MEM 培地 [Virology, 8, 396 (1959)]、199 培地 [Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73, 1 (1950)] またはこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等を用いることができる。

培養は、通常 pH6~8、30~40°C、5%CO₂ 存在下等の条件下で 1~7 日間行う。

また、培養中必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

昆虫細胞を宿主細胞として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されている TNM-FH 培地 (Pharmingen 社製)、Sf-900 II SFM 培地 (Life Technologies 社製)、ExCell400、ExCell405 (いずれも JRH Biosciences 社製)、Grace's Insect Medium [Grace, T.C.C., Nature, 195, 788 (1962)] 等を用いることができる。

培養は、通常 pH6~7、25~30°C 等の条件下で、1~5 日間行う。

また、培養中必要に応じて、ゲンタマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

上述の形質転換体の培養物から、心筋分化誘導因子蛋白質を単離精製するには、通常の蛋白質の単離、精製法を用いればよい。

例えば、心筋分化誘導因子蛋白質が、細胞内に溶解状態で発現した場合には、培養終了後、細胞を遠心分離により回収し水系緩衝液にけん濁後、超音波破碎機、フレンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザー、ダイノミル等により細胞を破碎し、無細胞抽出液を得る。該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られた上清から、通常の蛋白質の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル (DEAE) —セファロース、DIAION HPA-75 (三菱化学社製) 等レジンをを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF (Amersham Pharmacia Biotech 社製) 等のレジンをを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンをを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィ

ニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を単独あるいは組み合わせて用い、精製標品を得ることができる。

また、該蛋白質が細胞内に不溶体を形成して発現した場合は、細胞を回収後破碎し、遠心分離することにより、沈殿面分として蛋白質の不溶体を回収する。

回収した該蛋白質の不溶体を蛋白質変性剤で可溶化する。

該可溶化液を、希釈あるいは透析により、該可溶化液中の蛋白質変性剤の濃度を下げることにより、該蛋白質の構造を正常な立体構造に戻した後、上記と同様の単離精製法により該蛋白質の精製標品を得る。

心筋分化誘導因子蛋白質またはその糖修飾体等の誘導体が細胞外に分泌された場合には、培養上清から、該蛋白質またはその糖鎖付加体等の誘導体を回収することができる。即ち、培養物から遠心分離等の手法により培養上清を回収し、該培養上清から、上記と同様の単離精製法を用いることにより、精製標品を得ることができる。

このようにして取得される蛋白質として、例えば、配列番号 5、6、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28 および 30 で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質等をあげることができる。

また、上記方法により発現させた蛋白質を、Fmoc 法(フルオレニルメチルオキシカルボニル法)、tBoc 法(t-ブチルオキシカルボニル法)等の化学合成法によっても製造することができる。また、米国 Advanced ChemTech 社製、Perkin-Elmer 社製、Amersham Pharmacia Biotech 社製、米国 Protein Technology Instrument 社製、米国 Synthecell-Vega 社製、米国 PerSeptive 社製、島津製作所社製等のペプチド合成機を利用して合成することもできる。

心筋細胞への分化を誘導できる蛋白質は、上記(1)と同様にして心筋形成剤を形成し使用することができる。

7. 先天性遺伝子疾患の治療への利用

心不全をおこす疾患の中には、一部であるが単一遺伝子の変異により、本来心臓の分化または維持に必要な蛋白質の一部が欠損するために心不全となる一群がある。このような疾患としては、家族性肥大型心筋症、Fabri 病、QT 延長症候群、マルファン症候群、大動脈弁狭窄症、ミトコンドリア心筋症、Duchenne 型筋ジストロフィー症等があげられる。これらの疾患は、ミオシン、トロポニン、トロポミオシン、電位依存性 Na チャンネル、K チャンネル、

フィブリン、エラスティン、ミトコンドリア、ジストロフィンなどの遺伝子異常が原因であることが知られている[治療学, 30,1302-1306(1996)]。

上記疾患患者を治療する方法としては、疾患患者より本発明の心筋細胞への分化能を有する細胞を取得し、該細胞に正常な遺伝子を導入したのち、心臓に移植すること方法があげられる。正常な遺伝子は、上記6(1)で記載した遺伝子治療用のベクターに挿入したのちに、本発明の心筋細胞への分化能を有する細胞に導入することができる。

8. 心筋細胞への分化能を有する細胞特異的な表面抗原を特異的に認識する抗体の取得

以下に、本発明の心筋細胞への分化能を有する細胞で発現している表面抗原を特異的に認識する抗体の調製法について述べる。

本発明の心筋細胞への分化能を有する細胞で特異的に発現している表面抗原を認識する抗体は、心筋梗塞などの心臓病の細胞治療を実施する上で必要な心筋細胞への分化能を有する細胞の純度検定や精製に用いることができる。

該抗体を取得する方法として、本発明の心筋細胞への分化能を有する細胞 $3 \sim 5 \times 10^5$ cells/匹、あるいは該細胞から調製した細胞膜画分 $1 \sim 10$ mg/匹程を抗原として、ウサギ、ヤギまたは $3 \sim 20$ 週令のラット、マウスもしくはハムスター等の非ヒトほ乳動物の皮下、静脈内または腹腔内に、適当なアジュバント[例えば、フロイドの完全アジュバント(Complete Freund's Adjuvant)または、水酸化アルミニウムゲル、百日咳菌ワクチンなど]とともに投与する。

該抗原の投与は、1回目の投与の後 $1 \sim 2$ 週間おきに $3 \sim 10$ 回行う。各投与後、 $3 \sim 7$ 日目に眼底静脈叢より採血し、該血清が免疫に用いた抗原と反応するか否かを酵素免疫測定法[酵素免疫測定法(ELISA法);医学書院刊 1976年、Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988]などで調べる。

免疫に用いた抗原に対し、その血清が十分な抗体価を示した非ヒトほ乳動物を、血清または抗体産生細胞の供給源とする。

ポリクローナル抗体は、該血清を分離、精製することにより調製することができる。

モノクローナル抗体は、該抗体産生細胞と非ヒトほ乳動物由来の骨髓腫細胞とを融合させてハイブリドーマを作製し、該ハイブリドーマを培養するか、動物に投与して該動物を腹

水癌化させ、該培養液または腹水を分離、精製することにより調製することができる。

抗体産生細胞としては、脾細胞、リンパ節、末梢血中の抗体産生細胞、特に脾細胞が好適に用いられる。

骨髓腫細胞としては、8-アザグアニン耐性マウス(BALB/c 由来)骨髓腫細胞株である P3-X63Ag8-U1(P3-U1)株[Current Topics in Microbiology and Immunology, 18, 1 (1978)]、P3-NS1/1-Ag41(NS-1)株[European J. Immunology, 6, 511 (1976)]、SP2/O-Ag14(SP-2)株[Nature, 276, 269 (1978)]、P3-X63-Ag8653(653)株[J. Immunology, 123, 1548 (1979)]、P3-X63-Ag8(X63)株[Nature, 256, 495 (1975)]等、マウス由来の株化細胞が好適に用いられる。

ハイブリドーマ細胞は、以下の方法により作製できる。

抗体産生細胞と骨髓腫細胞を混合し、HAT培地(正常培地にヒポキサンチン、チミジンおよびアミノプテリンを加えた培地)に懸濁したのち、7~14日間培養する。培養後、培養上清の一部をとり酵素免疫測定法などにより、抗原に反応し、抗原を含まない蛋白質には反応しないものを選択する。ついで、限界希釈法によりクローニングを行い、酵素免疫測定法により安定して高い抗体価の認められたものをモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞として選択する。

ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を分離、精製する方法としては、遠心分離、硫酸沈殿、カプリル酸沈殿、または DEAE-セファロースカラム、陰イオン交換カラム、プロテイン A または G-カラムあるいはゲル濾過カラム等を用いるクロマトグラフィー等を、単独または組み合わせて処理する方法があげられる。

上記方法で取得した、該心筋細胞への分化能を有する細胞で発現している表面抗原を特異的に認識する抗体を用いて、検体細胞に対する反応性と造血系幹細胞、神経系幹細胞などの対照となる細胞に対する反応性とを比較することで、検体細胞が上記特異的 surface 抗原を発現しているかどうかを容易に検定することができる。

9. 心筋細胞への分化能を有する細胞で発現している表面抗原および該表面抗原をコードする遺伝子の取得

該心筋細胞への分化能を有する細胞で特異的に発現している表面抗原遺伝子の取得方法としては、二つの異なる由来のサンプル間で異なる発現形態を取る遺伝子を取得する

方法であるサブトラクション法[Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 5738-5742 (1988)]や Representational difference analysis[Nucleic Acids Research, 22, 5640-5648 (1994)]による方法をあげることができる。

まず、心筋細胞への分化能を有する細胞より作製した cDNA ライブラリーを、造血系幹細胞や神経系幹細胞などの心筋細胞への分化能を有する細胞以外の対照細胞より取得した mRNA を用いてサブトラクションを行う。心筋細胞への分化能を有する細胞特異的な遺伝子を濃縮した差分化 cDNA ライブラリーを調製した後、該差分化 cDNA ライブラリーの挿入 cDNA 配列を5'末端側よりランダムに塩基配列解析を行い、分泌シグナル配列を持つものだけを選択する(ランダム配列解析)。このようにして得られた cDNA の全長塩基配列を決定することにより、該 cDNA がコードする蛋白質が分泌蛋白質か膜蛋白質かを区別することができる。

上記の方法において、ランダム配列解析の代わりに、シグナルシーケンストラップ法も用いることもできる[Science, 261, 600-603 (1993); Nature Biotechnology, 17, 487-490 (1999)]。シグナルシーケンストラップ法とは、分泌シグナル配列をもつ遺伝子を選択的にスクリーニングする方法である。

効率よく特異的な表面抗原を取得するためには、シグナルシーケンストラップライブラリーをサブトラクションが行えるベクターを用いて作製し、心筋細胞への分化能を有する細胞から作製したシグナルシーケンストラップライブラリーを造血系幹細胞や神経系幹細胞などの対照となる細胞より取得した mRNA を用いてサブトラクションを行う方法が望ましい。このようにして取得された分泌シグナル配列を含む DNA 断片は全長 cDNA をクローン化するためのプローブとして用いることができる。

全長 cDNA はその全長塩基配列を解析することで、該 cDNA がコードする蛋白質が分泌蛋白質か膜蛋白質かを区別することができる。

ランダム配列解析あるいはシグナルシーケンストラップ法を用いた場合でも、得られたクローンが膜蛋白質をコードする場合は、塩基配列から類推されるアミノ酸配列に基づき合成ペプチドを作製し、該合成ペプチドを抗原として上記方法により特異的な抗体を取得することができる。

また、膜蛋白質の場合は、受容体をコードしているものがある。このような受容体は心筋

細胞への分化能を有する細胞の特異的な増殖、または心筋細胞への分化の調節に働いている可能性があり、当該受容体のリガンドの探索に用いることができる。分泌蛋白質の場合は、直接心筋細胞への分化能を有する細胞を増殖あるいは分化させるために用いることができる。

10. 心筋細胞への分化能を有する細胞の増殖因子および心筋細胞への分化誘導因子のスクリーニング

心筋細胞への分化能を有する細胞の増殖因子および心筋細胞への分化誘導因子のスクリーニング方法としては、心筋細胞への分化能を有する細胞を無血清培地中で培養させる際に、検体となる種々の物質を添加させ、該細胞が増殖するか、または心筋細胞へ分化誘導されるかで調べることにより行うことができる。

検体となる物質としては、各種サイトカインや増殖因子などの分泌蛋白質、細胞接着分子などの膜結合蛋白質、組織抽出液、合成ペプチド、合成化合物、微生物培養液等などいかなるものでもよい。

増殖能力はコロニー形成能や BrdU の取り込みなどで調べることができる。

コロニー形成能は、本発明の心筋細胞への分化能を有する細胞を低密度で播種することにより調べることができる。

BrdU の取り込みは、BrdU を特異的に認識する抗体を用いた免疫染色により調べることができる。

心筋細胞への分化を評価する方法としては、細胞の自律拍動を指標とする方法、細胞内に導入したレポーター遺伝子の発現を指標とする方法などがあげられる。

レポーター遺伝子の発現を指標とする方法は、心筋細胞で特異的に発現する遺伝子のプロモーターとレポーター遺伝子とを組み込んだベクターDNA を心筋細胞への分化能を有する細胞に導入し、該細胞を用いてレポーター遺伝子の発現を調べる方法である。

レポーター遺伝子としては、GFP(Green fluorescent protein)、ルシフェラーゼ、ベクターガラクトシダーゼをコードする遺伝子などがあげられる。

心筋細胞で特異的に発現する遺伝子のプロモーターとしては、cardiac troponin I(cTNI) があげられる[J. Biological Chemistry, 273, 25371-25380 (1998)]。

11. 心筋細胞への分化能を有する細胞の不老化

心臓疾患の患者、特に高齢者に対して本発明の治療薬を投与する場合、本発明の心筋細胞への分化能を有する細胞をガン化させずに細胞分裂の回数を増やすことが望ましい。

細胞をガン化させずに細胞分裂の回数を増やす方法としては、テロメラーゼを本発明の心筋細胞への分化能を有する細胞に発現させる方法をあげることができる。

テロメラーゼを本発明の心筋細胞への分化能を有する細胞に発現させる方法としては、テロメラーゼの触媒サブユニットである TERT 遺伝子、具体的には配列番号 32 で表される DNA を、レトロウイルスベクターに導入し、該ベクターを心筋細胞への分化能を有する細胞に導入する方法、心筋細胞への分化能を有する細胞に内在する TERT 遺伝子を誘導発現させる因子を心筋細胞への分化能を有する細胞に投与する方法、TERT 遺伝子を誘導発現させる因子をコードする DNA を含むベクターを心筋細胞への分化能を有する細胞に導入する方法などをあげることができる。

上述の TERT 遺伝子を誘導発現させる因子は、TERT 遺伝子プロモーターと GFP (Green Fluorescent protein)、ルシフェラーゼ、あるいはベクターガラクタシダーゼなどのレポーター遺伝子とを組み込んだベクターDNA を心筋細胞への分化能を有する細胞に導入することにより、TERT 遺伝子を誘導発現させる因子を選別することができる。

12. 心筋細胞への分化能を有する細胞を抗体を用いて分離する方法

生体内から取り出した各種組織から目的の表面抗原を発現している細胞を取得する方法としては、ソーティング機能を有したフローサイトメーターを用いる方法、磁気ビーズを用いる方法があげられる。

フローサイトメーターのソーティングの方式としては、水滴荷電方式、セルキャプチャー方式などがあげられる(フローサイトメーター自由自在、p14-23、秀潤社、1999年)。どちらの方法も、細胞の表面に発現している分子に結合した抗体から発せられる蛍光強度を電気信号に変換することにより抗原の発現量を定量することができる。また、使用する蛍光の種類を組み合わせることで、複数の表面抗原を利用して分離することも可能である。蛍光としては、FITC (fluorescein isothiocyanate)、PE (phycoerythrin)、APC (Allo-phyocyanin)、TR (TexasRed)、Cy3、CyChrome、Red613、Red670、PerCP、TRI-Color、QuantumRed など があげられる(フローサイトメーター自由自在、p3-13、秀潤社、1999年)。

染色方法としては、生体内から取り出した各種組織、具体的には骨髄または臍帯血から、遠心分離などの方法で細胞を分離したのち、直接抗体で染色する方法、一度適当な培地中で培養・増殖を行った後に抗体で染色する方法があげられる。

細胞の染色はまず、表面抗原を認識する一次抗体と目的の細胞サンプルを混合し、氷上で30分間～1時間、インキュベーションする。一次抗体が蛍光で標識されている場合には、洗浄後フローサイトメーターで分離を行う。一次抗体が蛍光標識されていない場合には、洗浄後一次抗体に対して結合活性を有する蛍光標識された二次抗体と一次抗体が反応した細胞とを混合し、再び氷上で30分間～1時間、インキュベーションする。洗浄後、一次抗体と二次抗体で染色された細胞をフローサイトメーターで分離を行う。

磁気ビーズを用いる方法では、目的の表面抗原を発現している細胞を大量に分離することができる。分離の純度は上述のフローサイトメーターを用いる方法には及ばないが、精製を繰り返すことにより、十分高い細胞純度を確保することができる。

細胞に一次抗体を反応させた後、細胞と反応しなかった一次抗体を除去し、一次抗体と特異的に結合する磁気ビーズを結合させた二次抗体を結合させる。残存する二次抗体を洗浄除去した細胞は磁石を設置したスタンドで分離することができる。これらの操作に必要な材料および装置は DYNAL 社から入手することができる。

磁気ビーズを用いる方法は、細胞サンプル中より不要な細胞を除去するのにも同様に利用することができる。不要な細胞をより効率的に除去するには Stem Cell Technologies Inc(Vancouver, Canada)より販売されている StemSep 法を用いることができる。

上述の方法で用いられる抗体としては、前記8で取得された抗体、または造血系細胞の表面抗原である CD34、CD117、CD14、CD45、CD90、Sca-1、Ly6c、Ly6g を認識する抗体、血管内皮細胞の表面抗原である Flk-1、CD31、CD105、CD144 を認識する抗体、間葉系細胞の表面抗原である CD140 を認識する抗体、インテグリンの表面抗原である CD49b、CD49d、CD29、CD41 を認識する抗体、マトリックス受容体である CD54、CD102、CD106、CD44 を認識する抗体があげられる。これらの抗体を組み合わせることで、より高い純度で目的の細胞を取得することができる。

具体的には、CD34 陰性、CD117 陽性、CD144 陰性細胞および CD140 陽性の性質を有する細胞を取得するには、ヒト骨髄細胞から CD34 陽性細胞と CD144 陽性細胞を上述した

免疫磁気ビーズの方法などを利用して除去した後、CD117 陽性および CD140 陽性の細胞画分を分取することで目的の細胞を分離することができる。

13. 心筋特異的な遺伝子のプロモーターレポーターベクターを用いた心筋前駆細胞の分離

心筋細胞への分化能を有する細胞から誘導した心筋細胞または心筋細胞の前駆細胞を効率的に分離するために、発光オワンクラゲの緑色蛍光蛋白質 (green fluorescent protein; GFP) を遺伝子導入のためのレポーター遺伝子の指標として用いることができる。

具体的には、心筋細胞で特異的に発現している遺伝子または前記9項で取得した心筋細胞への分化能を有する細胞で特異的に発現している遺伝子のプロモーターの下流に GFP 遺伝子をつないだベクターを作製し、心筋細胞への分化能を有する細胞に導入する。このようなレポーターベクターを導入された細胞を薬剤耐性などの指標で分離後、心筋細胞へと分化誘導する。分化誘導した細胞は GFP を発現し、蛍光を発生する。蛍光を発生した心筋細胞ならびに心筋前駆細胞はフローサイトメーターを用いて容易に分離することができる (フローサイトメーター自由自在、p44-52、秀潤社、1999年)。

心筋細胞で特異的に発現している遺伝子のプロモーターとしては MLC2v やトロポニンI を用いることができる。

ベクターとしては、上述した動物細胞用のプラスミドベクター、アデノウイルスベクターなどを用いることができる。

14. 心筋細胞への分化能を有する細胞から各種細胞への分化の誘導

(1) 心筋細胞への分化能を有する細胞から脂肪細胞への分化の誘導

心筋細胞への分化能を有する細胞から脂肪細胞への分化を誘導する方法としては、核内受容体 PPAR- γ を活性化する因子を 0.4 μ M から 2 μ M の終濃度となるよう培地中に添加する方法が挙げられる。核内受容体 PPAR- γ の活性化因子としては、トログリダゾン、ピオグリタゾン、ロジグリタゾン等のチアゾリジオン骨格を有する化合物をあげることができる。

または、培養皿一面に密集した細胞の培地中に、終濃度が 1 μ M dexamethasone、0.5 mM methyl-isobutylxanthine、0.01 mg/ml insulin、0.2 mM indomethacin となるように、それぞれを添加した培地で培養する方法も挙げられる。

(2) 心筋細胞への分化能を有する細胞から軟骨細胞への分化の誘導

心筋細胞への分化能を有する細胞から軟骨細胞への分化を誘導する方法としては、 $1 \times 10^5 \sim 3 \times 10^6$ 個の細胞を遠心分離して得られた凝集塊に、終濃度が $0.01 \mu\text{g/ml}$ となるような TGF $\beta 3$ を含む培地で培養する方法が挙げられる。

(3) 心筋細胞への分化能を有する細胞から骨芽細胞への分化の誘導

心筋細胞への分化能を有する細胞から骨芽細胞への分化を誘導する方法としては、細胞の培地中に終濃度 $0.1 \mu\text{M}$ dexamethasone、 0.05 mM ascorbic acid-2-phosphate、 10 mM β -glycerophosphate となるように、それぞれを添加した培地中で培養する方法が挙げられる。

15. Hoechst 33342 を用いた心筋細胞への分化能を有する細胞の分離

Hoechst 33342 は DNA 結合色素であり、生きたままの細胞を染色することができる。骨髓細胞の大多数は激しく分裂しているため、非常に明るく染色されるが、未熟な細胞ほど暗く染まる。これは、ABC (ATP binding cassette) トランスポーターによる色素排除能力が未熟な細胞ほど大きいことが知られている(中内啓光、蛋白質核酸酵素、Vol.45, No.13, 2056-2062, 2000)。従って、Hoechst 33342 を取り込まない細胞を分離することにより、本発明の心筋細胞への分化能を有する細胞を単離することができる。

骨髓中から Hoechst 33342 で暗く染まる細胞を分離するには、骨髓細胞を Hoechst 33342 で染色した後、FACS を用いて UV レーザーをあてて短波長と長波長の2重染色を行うことにより解析を行うことができる。Hoechst 33342 を取り込まない未熟な細胞は Side population として分画することができる[Goodell, MA et al. J.Exp.Med., 183, 1797-1806 (1996)、http://www.bcm.tmc.edu/genetherapy/goodell/new_site/index2.html]。

図面の簡単な説明

図1は、KUM 2細胞(A)および BMSC 細胞(B)にそれぞれ、ビオチン化した抗マウス CD105 抗体を用いて抗体反応をおこない、フローサイトメーターで測定した結果である。縦軸は細胞数、横軸は蛍光強度を示す。灰色で塗りつぶした部分が抗体反応の結果であり、実線は陰性対象の結果である。

図2は、KUM 2細胞(A)および BMSC 細胞(B)にそれぞれ、ビオチン化した抗マウス Flk1 抗体を用いて抗体反応をおこない、フローサイトメーターで測定した結果である。縦軸は細胞数、横軸は蛍光強度を示す。灰色で塗りつぶした部分が抗体反応の結果であり、実線は

陰性対象の結果である。

図3は、KUM 2細胞 (A) および BMSC 細胞(B)にそれぞれ、FITC 標識した抗マウス CD31 抗体を用いて抗体反応をおこない、フローサイトメーターで測定した結果である。縦軸は細胞数、横軸は蛍光強度を示す。灰色で塗りつぶした部分が抗体反応の結果であり、実線は陰性対象の結果である。

図4は、KUM 2細胞 (A) および BMSC 細胞(B)にそれぞれ、ビオチン化した抗マウス CD144 抗体を用いて抗体反応をおこない、フローサイトメーターで測定した結果である。縦軸は細胞数、横軸は蛍光強度を示す。灰色で塗りつぶした部分が抗体反応の結果であり、実線は陰性対象の結果である。

図5は、KUM 2細胞 (A) および BMSC 細胞(B)にそれぞれ、FITC 標識した抗マウス CD34 抗体を用いて抗体反応をおこない、フローサイトメーターで測定した結果である。縦軸は細胞数、横軸は蛍光強度を示す。灰色で塗りつぶした部分が抗体反応の結果であり、実線は陰性対象の結果である。

図6は、KUM 2細胞 (A) および BMSC 細胞(B)にそれぞれ、FITC 標識した抗マウス CD117(c-kit)抗体を用いて抗体反応をおこない、フローサイトメーターで測定した結果である。縦軸は細胞数、横軸は蛍光強度を示す。灰色で塗りつぶした部分が抗体反応の結果であり、実線は陰性対象の結果である。

図7は、KUM 2細胞 (A) および BMSC 細胞(B)にそれぞれ、FITC 標識した抗マウス CD14 抗体を用いて抗体反応をおこない、フローサイトメーターで測定した結果である。縦軸は細胞数、横軸は蛍光強度を示す。灰色で塗りつぶした部分が抗体反応の結果であり、実線は陰性対象の結果である。

図8は、KUM 2細胞 (A) および BMSC 細胞(B)にそれぞれ、FITC 標識した抗マウス CD45 抗体を用いて抗体反応をおこない、フローサイトメーターで測定した結果である。縦軸は細胞数、横軸は蛍光強度を示す。灰色で塗りつぶした部分が抗体反応の結果であり、実線は陰性対象の結果である。

図9は、KUM 2細胞 (A) および BMSC 細胞(B)にそれぞれ、FITC 標識した抗マウス CD90 抗体を用いて抗体反応をおこない、フローサイトメーターで測定した結果である。縦軸は細胞数、横軸は蛍光強度を示す。灰色で塗りつぶした部分が抗体反応の結果であり、実線

は陰性対象の結果である。

図10は、KUM 2細胞 (A) および BMSC 細胞(B)にそれぞれ、FITC 標識した抗マウス Ly6A/E(Sca-1)抗体を用いて抗体反応をおこない、フローサイトメーターで測定した結果である。縦軸は細胞数、横軸は蛍光強度を示す。灰色で塗りつぶした部分が抗体反応の結果であり、実線は陰性対象の結果である。

図11は、KUM 2細胞 (A) および BMSC 細胞(B)にそれぞれ、FITC 標識した抗マウス Ly6c 抗体を用いて抗体反応をおこない、フローサイトメーターで測定した結果である。縦軸は細胞数、横軸は蛍光強度を示す。灰色で塗りつぶした部分が抗体反応の結果であり、実線は陰性対象の結果である。

図12は、KUM 2細胞 (A) および BMSC 細胞(B)にそれぞれ、FITC 標識した抗マウス Ly6g 抗体を用いて抗体反応をおこない、フローサイトメーターで測定した結果である。縦軸は細胞数、横軸は蛍光強度を示す。灰色で塗りつぶした部分が抗体反応の結果であり、実線は陰性対象の結果である。

図13は、KUM 2細胞 (A) および BMSC 細胞(B)にそれぞれ、ビオチン化した抗マウス CD140 抗体を用いて抗体反応をおこない、フローサイトメーターで測定した結果である。縦軸は細胞数、横軸は蛍光強度を示す。灰色で塗りつぶした部分が抗体反応の結果であり、実線は陰性対象の結果である。

図14は、KUM 2細胞 (A) および BMSC 細胞(B)にそれぞれ、FITC 標識した抗マウス CD49b 抗体を用いて抗体反応をおこない、フローサイトメーターで測定した結果である。縦軸は細胞数、横軸は蛍光強度を示す。灰色で塗りつぶした部分が抗体反応の結果であり、実線は陰性対象の結果である。

図15は、KUM 2細胞 (A) および BMSC 細胞(B)にそれぞれ、FITC 標識した抗マウス CD49d 抗体を用いて抗体反応をおこない、フローサイトメーターで測定した結果である。縦軸は細胞数、横軸は蛍光強度を示す。灰色で塗りつぶした部分が抗体反応の結果であり、実線は陰性対象の結果である。

図16は、KUM 2細胞 (A) および BMSC 細胞(B)にそれぞれ、FITC 標識した抗マウス CD29 抗体を用いて抗体反応をおこない、フローサイトメーターで測定した結果である。縦軸は細胞数、横軸は蛍光強度を示す。灰色で塗りつぶした部分が抗体反応の結果であり、

実線は陰性対象の結果である。

図17は、KUM 2細胞 (A) および BMSC 細胞(B)にそれぞれ、FITC 標識した抗マウス CD54 抗体を用いて抗体反応をおこない、フローサイトメーターで測定した結果である。縦軸は細胞数、横軸は蛍光強度を示す。灰色で塗りつぶした部分が抗体反応の結果であり、実線は陰性対象の結果である。

図18は、KUM 2細胞 (A) および BMSC 細胞(B)にそれぞれ、FITC 標識した抗マウス CD102 抗体を用いて抗体反応をおこない、フローサイトメーターで測定した結果である。縦軸は細胞数、横軸は蛍光強度を示す。灰色で塗りつぶした部分が抗体反応の結果であり、実線は陰性対象の結果である。

図19は、KUM 2細胞 (A) および BMSC 細胞(B)にそれぞれ、FITC 標識した抗マウス CD106 抗体を用いて抗体反応をおこない、フローサイトメーターで測定した結果である。縦軸は細胞数、横軸は蛍光強度を示す。灰色で塗りつぶした部分が抗体反応の結果であり、実線は陰性対象の結果である。

図20は、KUM 2細胞 (A) および BMSC 細胞(B)にそれぞれ、FITC 標識した抗マウス CD44 抗体を用いて抗体反応をおこない、フローサイトメーターで測定した結果である。縦軸は細胞数、横軸は蛍光強度を示す。灰色で塗りつぶした部分が抗体反応の結果であり、実線は陰性対象の結果である。

以下に実施例をあげて、本発明を具体的に示す。

発明を実施するための最良の形態

実施例1. マウス骨髄からの心筋細胞への分化能を有する骨髄細胞の取得と培養

5週齢の C3H/He マウス 10 匹をエーテルを用いて麻酔し、そのうえで頸椎脱臼により致死させた。マウスを半側臥位にして、70%エタノールを充分かけ消毒した。

次に大腿骨周辺の皮膚を広い範囲にわたり切開し、大腿骨全面の大腿四頭筋をはさみで切除した。膝関節の部分に軽くはさみを入れ、関節を外し、さらに大腿骨背面の筋肉を切除した。股関節の部分にはさみを入れ関節を外し、大腿骨を取り出した。大腿骨に付着している筋肉をはさみで切除し、大腿骨全体を露出させた。大腿骨の両端をはさみで切断後、テルモ製 23G の針を装着した 2.5ml 注射器に 20%FCS を含有する IMDM 培地を約

1.5ml 入れ、注射針の先端を大腿骨の膝関節側の断端に差し込み、試験管の中に培養液を吹き出すことで、骨髓細胞を押し出した。取得した細胞は、20%FCS、100mg/ml penicillin、250ng/ml streptomycin、85mg/ml amphotericin を含有する IMDM 培地中で 33°C で、5% CO₂ 濃度の孵卵機を用いて培養を行った。継代を続けることで、細胞は間葉系の細胞へと均一化し、造血系の細胞は消失した。

約4ヶ月上記条件で培養を行い、不死化した細胞を選択した後、希釈により 192 種類の独立した単一細胞(single cell)由来の細胞株を樹立した(以下、骨髓由来初代不死化細胞株と称する)。これら独立のクローン由来の細胞にそれぞれに 3 μ M の終濃度になるように 5-aza-C を添加し 24 時間培養した後、培地を IMDM 培地に代えてさらに 2 週間培養することで拍動する細胞を産生するクローンを選択した。骨髓由来初代不死化細胞 192 個のうち、心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞は3個であった。このうちの1つがKUM2である。以後、骨髓細胞KUM2ならびに後述する多分化能幹細胞BMSCは特別な指定がない限り、20%FCS、100mg/ml penicillin、250ng/ml streptomycin、85mg/ml amphotericin を含有する IMDM 培地中で 33°C で、5% CO₂ 濃度の孵卵機を用いて培養を行った。KUM2 細胞は 3 μ M の終濃度の 5-aza-C に 24 時間曝露することで、非特異的に自己拍動する心筋細胞が分化誘導してくるが、その頻度は非常に低かった(10⁷ cell に1つ以下)。

しかし、KUM2 細胞から出現する自己拍動する細胞周辺をクローニングシリンジで採取すると、増殖能の高い多分化能幹細胞 BMSC(FERM BP-7043)と、限られた回数のみ増殖し心筋細胞へと分化する細胞(以下、単に心筋前駆細胞と称する)の少なくとも2種類の細胞が観察された。BMSC 細胞は、クローニングシリンジで回収した後、細胞を継代培養し、不死化する細胞を選別することで、クローン化を行った。BMSC 細胞は、その親株となる KUM2 よりも 100 倍以上効率的に分化誘導することが観察された。また心筋前駆細胞は再び 5-aza-C を添加し 24 時間培養した後、培地を IMDM 培地に代えてさらに 2~3 週間培養することで多くの自律拍動する細胞が効率的に出現した。該心筋前駆細胞は、増殖条件下では、単核の線維芽細胞様の形態を呈し、心筋収縮蛋白質はほとんど発現していない。しかし 5-aza-C により最終分化を誘導すると形態は著しく変化した。

分化誘導1週間目頃より、一部の細胞は細胞質が大きくなり円形あるいは棒状を呈し、後に自律拍動を開始する細胞となるが、この時点では自律拍動を行うことは少なかった。分

化誘導後2週間になると、自己拍動を開始した。この自己拍動した細胞は互いに連結しあい、縦に連結して筋管細胞様となった。3週間以後には多くの細胞が縦に1列にならび、同期して収縮した。分化後4週間以後には培養皿の上の直接連結される細胞は、すべて同期して収縮し心筋組織様になった。マウスの心臓は、毎分300～400回程度の心拍数で収縮するが、これに対してマウス成体骨髄由来の細胞より分化した心筋細胞は、培養条件下において毎分120～250回の速さで規則的に収縮した。

実施例2. マウス骨髄細胞から誘導される心筋細胞の特性

骨髄由来細胞から形成される自律拍動する心筋様細胞が、実際に心筋細胞の性質を保有しているかどうかの解析を行った。

実施例1で取得した、骨髄由来初代不死化細胞株、マウス骨髄由来多分化能幹細胞BMSC および心筋前駆細胞から分化誘導した心筋細胞から、それぞれ Trizol Reagents(GIBCO BRL 社製)を用いて全RNAを取得した。次に、該全RNAを基質として SuperscriptII reverse transcriptase(GIBCO BRL 社製)を用いて First strand cDNA を合成した。

次に、心筋細胞特異的な遺伝子の発現を検討するために、該 First strand cDNA を基質として、配列番号33～58に示した塩基配列を有する合成DNAを用いて定量的PCRを行った。心筋細胞特異的な遺伝子としては、ナトリウム利尿ペプチドであるANPおよびBNP、ミオシン重鎖である α -MHCおよび β -MHC、アクチンである α -skeletal actin および β -skeletal actin、ミオシン軽鎖であるMLC-2a、MLC-2v、心筋細胞特異的転写因子であるNkx2.5/Csx、GATA4、TEF-1、MEF-2C、MEF-2D、MEF-2Aを用いた。

ANPの増幅には配列番号33、34の塩基配列を有する合成DNAを、BNPの増幅には配列番号35、36の塩基配列を有する合成DNAを、 α -MHCの増幅には配列番号37、38の塩基配列を有する合成DNAを、 β -MHCの増幅には配列番号39、40の塩基配列を有する合成DNAを、 α -skeletal actinの増幅には配列番号41、42の塩基配列を有する合成DNAを、 β -skeletal actinの増幅には配列番号43、44の塩基配列を有する合成DNAを、MLC-2aの増幅には配列番号45、46の塩基配列を有する合成DNAを、MLC-2vの増幅には配列番号47、48の塩基配列を有する合成DNAを、Nkx2.5/Csxの増幅には配列番号49、50の塩基配列を有する合成DNAを、GATA4の増幅には配列番号51、52の塩基配

列を有する合成 DNA を、TEF-1 の増幅には配列番号 53、54 の塩基配列を有する合成 DNA を、MEF-2C の増幅には配列番号 55、56 の塩基配列を有する合成 DNA を、MEF-2D の増幅には配列番号 57、58 の塩基配列を有する合成 DNA を、MEF-2A の増幅には配列番号 59、60 の塩基配列を有する合成 DNA を用いた。

生体内で分化誘導する心筋細胞は、心筋収縮の心拍数またはエネルギー効率に違いを持たせるために、胎児期、新生児期あるいは成熟期によって、または心房筋あるいは心室筋の相違によって、心筋収縮蛋白質のアイソフォームに違いがある。

培養系で心筋細胞に分化した骨髄細胞の場合、アイソフォームの発現様式は α -アクチンの場合は骨格筋型のほうが心筋型より多く発現し、ミオシン重鎖の場合は β 型のほうが α 型よりも多く発現していた。ミオシン軽鎖では 2v 型が発現しているのに対し、2a 型の発現は観察されなかった。

また、培養系で心筋細胞に分化した骨髄細胞の分化誘導後には、ナトリウム利尿ペプチドである ANP および BNP の発現が見られた。以上の心筋収縮蛋白質の発現様式より判断すると、培養系で心筋細胞に分化した骨髄細胞の表現型は胎児型心室筋細胞の形質を有すると考えられる。

培養系で心筋細胞に分化した骨髄細胞では、Nkx2.5/Csx、GATA4、MEF-2A、MEF-2C、MEF-2D、TEF-1 遺伝子の発現が観察された。増殖中の骨髄由来初代不死化細胞株ではこれらの転写因子の発現は認められなかったが、増殖中の骨髄由来心筋前駆細胞では Nkx2.5/Csx、GATA4 および MEF-2C の発現が観察され、心筋細胞への分化誘導に伴い、遅れて MEF-2A および MEF-2D の発現誘導が観察された。

次に、ガラス微小電極により、培養系で心筋細胞に分化した骨髄細胞の活動電位を記録した。活動電位は、細胞を 1.49mM CaCl_2 、4.23mM KCl、25mM HEPES(pH7.4)を添加した IMDM 培地中で培養し、Diaphoto-300 実体顕微鏡(ニコン社製)下、温度 25°C で測定した。ガラス電極は電極抵抗を 15~30 Ω に設定して 3M KCl を充填した。膜電位の測定は MEZ-8300(日本光電社製)を用いて電流クランプモードで行った。測定結果は RTA-1100M(日本光電社製)を用いて熱感紙に記録した。その結果、培養系で心筋細胞に分化した骨髄細胞は、洞結節細胞型と心室筋細胞型の 2 種類が観察された。両者に共通する活動電位の特徴は、①活動電位持続時間が長いこと、②比較的浅い静止期電位を持つこ

と、③ペースメーカー細胞にみられる静止期電位の緩やかな脱分極が認められることであった。また、心室筋細胞型では活動電位は Peak&Dome 型 (活動電位第1相を持つ) を呈した。洞結節細胞型の活動電位持続時間、拡張期膜電位、活動電位振幅は従来ウサギやラットで報告されている洞結節の活動電位と近似していた。心室筋細胞型ではこれに比べて、静止期膜電位は深く、活動電位振幅は大きい傾向を示した。分化誘導後、2~3 週間の細胞はすべて洞結節細胞型が記録されたが、分化誘導後4週間頃より心室筋細胞型が観察され時間経過とともに次第に増加した。

実施例3. サイトカインを用いた心筋細胞への分化の促進

心筋細胞への分化能を有するマウス骨髄細胞の心筋分化誘導率を増加させるため、5-aza-C で分化誘導をおこなう際に、各種サイトカインを添加して誘導率が増加するかどうか解析をおこなった。

心筋細胞への分化能を有するマウス骨髄由来多分化能幹細胞(BMSC)を 2×10^4 細胞/ml となるように 60mm 培養ディッシュあるいは 60mm フィブロネクチン付着ディッシュ (fibronectin-coated dish: Becton Dickinson 社製) に蒔き、33°C、5%CO₂ 濃度の孵卵機を用いて培養を行った。

翌日、該培養液に 5-aza-C を終濃度 3 μ M となるよう添加した上で、更に、PDGF のみ添加 (培養ディッシュA)、PDGF とレチノイン酸の両方添加 (培養ディッシュB)、添加なし (培養ディッシュC) の 3 種類の異なる処理を行い培養を継続した (終濃度は PDGF は 10ng/ml、レチノイン酸は 10⁻⁹M)。

翌日 5-aza-C を培地から除去するために、培地を新しいものに交換し、再び培養ディッシュAには PDGF を終濃度 10ng/ml になるように添加し、培養ディッシュBには PDGF を終濃度 10ng/ml とレチノイン酸を終濃度 10⁻⁹M になるように添加した。それから更に 2 日後、4 日後にも同様の培地交換と PDGF あるいはレチノイン酸の添加を行った。

薬剤を加えてから4週間後、細胞の形態を位相差顕微鏡下で観察した。その結果、5-aza-C のみを添加した培養ディッシュでは約 3 割の細胞が筋管様細胞となるのに対し、PDGF を添加すると約4割、PDGF とレチノイン酸を同時に添加すると約 5 割の細胞が筋管様細胞となった。また、フィブロネクチン付着ディッシュの3群では、培養ディッシュの3群に比べて、筋管様細胞になる細胞数が約 1 割程度ずつ増加した。

得られた、筋管様細胞から RNA を回収して、該筋管様細胞で発現している遺伝子を配列番号71～78で示した合成オリゴヌクレオチドを用いて定量的 PCR を解析したところ、PDGFあるいはレチノイン酸は骨格筋に関係する MyoD、fTnI 遺伝子の発現を亢進するが、心筋に特異的に関係する cTnI、ANP の発現は誘導しなかった。

次に、心筋細胞への分化能を有するマウス骨髄由来多分化能幹細胞(BMSC)を 2×10^4 細胞/ml となるように 60mm 培養ディッシュに蒔き、33°C、5%CO₂ 濃度の孵卵機を用いて培養を行った。

翌日、該培養液に 5-aza-C を終濃度 3 μ M となるよう添加した上で、更に、FGF-8 を終濃度 10ng/ml になるように添加（培養ディッシュD）、ET-1 を終濃度 10ng/ml になるように添加（培養ディッシュE）、Midkine を終濃度 10ng/ml になるように添加（培養ディッシュF）、BMP4 を終濃度 10ng/ml になるように添加（培養ディッシュG）、添加なし（培養ディッシュH）の5種類の異なる処理を行い培養を継続した。

翌日 5-aza-C を培地から除去するために、培地を新しいものに交換し、再び培養ディッシュDには FGF-8 を終濃度 10ng/ml になるように添加し、培養ディッシュEには ET-1 を終濃度 10ng/ml になるように添加、培養ディッシュFには Midkine を終濃度 10ng/ml になるように添加、培養ディッシュGには BMP4 を終濃度 10ng/ml になるように添加して培養を継続した。それから更に 2 日後、4 日後にも同様の培地交換と FGF-8、ET-1、Midkine あるいは BMP4 の添加を行った。

5-aza-C を加えてから4週間後、細胞の形態を位相差顕微鏡下で観察した。その結果、5-aza-C のみを添加した培養ディッシュでは約 3 割の細胞が筋管様細胞となるのに対し、FGF-8、ET-1、Midkine あるいは BMP4 を添加した培養ディッシュでは約 5 割の細胞が筋管様細胞となった。

得られた、筋管様細胞から RNA を回収して、該筋管様細胞で発現している遺伝子を配列番号71～78で示した合成オリゴヌクレオチドを用いて定量的 PCR 解析を行ったところ、FGF-8、ET-1、Midkine あるいは BMP4 は、それぞれ単独で心筋に特異的な遺伝子である cTnI、ANP の発現を亢進することが観察された。

実施例4. DMSO を用いた骨髄由来幹細胞からの心筋細胞への分化誘導

実施例1に示した方法により、取得した心筋細胞への分化能のあるマウス骨髄由来多分

化能幹細胞(BMSC)に $3 \mu\text{M}$ の 5-aza-C の代わりに $10 \mu\text{M}$ の DMSO を添加し24時間培養した後、培地を IMDM 培地に代えて、さらに6週間培養を続けた。

その結果、拍動する心筋細胞が分化誘導されることを見出し、これらの細胞には Nkx2.5/Csx および GATA4 遺伝子が発現しており、5-aza-C を添加したときと同様の性質を有した心筋細胞であることが示された。この解析結果は、5-aza-C と DMSO の共通の機能である染色体 DNA の脱メチル化が心筋細胞の分化に必要であることを示している。

実施例5. 心筋細胞への分化能を有するマウス骨髄由来多分化能幹細胞が多分化能を有する幹細胞および心筋前駆細胞であることの証明

マウス骨髄由来多分化能幹細胞(BMSC)から分化誘導する拍動細胞が心筋細胞の性質を保有していることは示されたが、心筋細胞への分化能を有するマウス骨髄由来多分化能幹細胞(BMSC)に、心筋前駆細胞が存在しているのか、より未分化で心筋細胞以外の、例えば脂肪細胞などに分化可能な幹細胞が存在するかを調べるため、シングルセル・マーキング (Single cell marking) の実験を行った。

具体的には、分化誘導を行う前に、ある1つの細胞に GFP 遺伝子をウィルスベクターを導入して標識し、その後分化誘導させて標識した細胞がどのような細胞に分化したかで判断した。

まず、GFP 遺伝子を発現させるレトロウイルスベクタープラスミド GAR3-GFP および、Ecotropic 遺伝子を発現させる pCMV-Eco プラスミドベクターを、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)等に記載のアルカリ中和法および PEG 沈殿法を用いて、純度の高い DNA を取得した。

この DNA をトランスフェクションさせる前日に、コンフルエントになった、gag および pol 遺伝子を保有する 293 細胞を 1/5 希釈で 10cm ディッシュに継代し、一晩 37°C 、5% CO_2 濃度の孵卵機を用いて培養をおこなった。

トランスフェクションは以下の通りに行った。

GAR3-GFP レトロウイルスベクタープラスミド DNA $15 \mu\text{g}$ と pCMV-Eco プラスミドベクター DNA $5 \mu\text{g}$ を 250mM CaCl_2 (pH6.95) 0.5ml に加えて溶解させ、その溶液を 15ml のチューブに入れた $2 \times \text{BBS}$ [50mM BES(N,N-bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethanesulfonic acid)、280mM NaCl、1.5mM Na_2HPO_4 (pH6.95)] 0.5ml に滴下して 10 分間室温で静置させた。そ

の後、このDNA溶液を、前日に用意した293細胞培地中に滴下させ、37°C、5%CO₂濃度の孵卵機を用いて培養を行った。翌日、培地を交換し、更に37°C、5%CO₂濃度の孵卵機を用いて培養を行った。

培地を交換して2日後に、培養上清を0.45 μmのフィルター(Millipore社製)でろ過し、ウィルスベクターを含む溶液を回収した。この溶液をIMDM培地で10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁶に希釈した。

ウィルスベクターを導入される側の心筋細胞への分化能を有するマウス骨髄由来多分化能幹細胞は、ウィルスをインフェクションさせる前日に2×10⁴細胞/ウェルとなるように6ウェル・ディッシュに蒔いた。

希釈した、ウィルスベクターを含む溶液には、終濃度8 μg/mlとなるように、Hexadimethrine bromide(polybrene)(Sigma社製)を添加し、心筋細胞への分化能を有するマウス骨髄由来多分化能幹細胞(BMSC)の培養上清2mlをウィルス液2mlと置換し、33°C、5%CO₂濃度の孵卵機を用いて培養をおこなった。5時間後、培養上清を新しいIMDM培地に交換し、更に33°C、5%CO₂濃度の孵卵機を用いて培養を行った。

2日間培養を行った後、蛍光顕微鏡下でGFPを発現している細胞を観察し、細胞1000個あたり1つのGFP陽性細胞があるような細胞群を得た。

該細胞を8×10³細胞/ディッシュとなるよう、35mmガラスベースディッシュ(旭テクノグラス社製)に蒔き、33°C、5%CO₂濃度の孵卵機を用いて培養を行った。

翌日、5-aza-C(Sigma社製)、PDGF-BB(Peprotech社製)、all trans レチノイン酸(Sigma社製)をそれぞれ終濃度3 μM、10ng/ml、10⁻⁹Mとなるよう添加し、添加して2日後および4日後には、培地交換を行うとともに、再度PDGF-BB(以降PDGFと略す)、all trans レチノイン酸を上述と同じ濃度で添加した。

4週間後、蛍光顕微鏡でGFP陽性細胞がどのように分化したかを観察すると、心筋細胞のみがGFP陽性になっている細胞集団、心筋細胞と未分化幹細胞がGFP陽性になっている細胞集団、ならびに心筋細胞、脂肪細胞および未分化幹細胞の3者がGFP陽性になっている細胞集団の3種類の細胞集団が見られた。すなわち、多分化能幹細胞から心筋前駆細胞が確率的(stochastic)に分化誘導してくることが明らかとなった。またこの結果は、心筋細胞への分化能を有するマウス骨髄細胞には多分化能を有する幹細胞が存在する

ことを示した。

実施例6. 転写因子の強制発現による心筋細胞分化の促進

マウス心筋細胞への分化能を有するマウス骨髄由来多分化能幹細胞(BMSC)に心筋細胞分化に関係する転写因子を強制的に発現させることによる心筋細胞への分化に与える影響を解析した。

具体的には、分化誘導を行う前に、Nkx2.5/CsxまたはGATA4遺伝子をウィルスベクターを用いて導入して、その後分化誘導させて心筋細胞への分化の効率を検討した。

まず、Nkx2.5/Csxを発現させる目的で、レトロウイルスベクタープラスミド pCLNCX (Imgenex 社)に Nkx2.5/Csxを組み込み、pCLNC-Nkx2.5/Csxを調製した。

また、GATA4を発現させる目的で、レトロウイルスベクタープラスミド pCLNCX (Imgenex 社)の G418 耐性遺伝子部分をピューロマイシン耐性遺伝子に置換したプラスミド pCLPCX に、GATA4を組み込み、pCLPC-GATA4を調製した。レトロウイルスベクタープラスミド pCLNC-Nkx2.5/CsxとpCLPC-GATA4および、Ecotropic 遺伝子を発現させる pCMV-Eco プラスミドベクター (Imgenex 社)を、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)等に記載のアルカリ中和法および PEG 沈殿法を用いて、純度の高い DNA を取得した。

これらの DNA をトランスフェクションさせる前日に、コンフルエントになった、gag および pol 遺伝子を保有する 293 細胞を 1/5 希釈で 10cm ディッシュに継代し、一晚 37°C、5%CO₂ 濃度の孵卵機を用いて培養を行った。

トランスフェクションは以下の通りにおこなった。

pCLNC-Nkx2.5/Csx あるいは pCLPC-GATA4 レトロウイルスベクタープラスミド DNA 15 μ g と pCMV-Eco プラスミドベクター DNA 5 μ g を 250mM CaCl₂ (pH6.95) 0.5ml に加えて溶解させ、その溶液を 15ml のチューブに入れた 2×BBS [50mM BES(N,N-bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethanesulfonic acid), 280mM NaCl, 1.5mM Na₂HPO₄ (pH6.95)] 0.5ml に滴下して 10 分間室温で静置させた。その後、この DNA 溶液を、前日に用意した 293 細胞培地中に滴下させ、37°C、5%CO₂ 濃度の孵卵機を用いて培養を行った。翌日、培地を交換し、更に 37°C、5%CO₂ 濃度の孵卵機を用いて培養を行った。

培地を交換して 2 日後に、培養上清を 0.45 μ m のフィルター (Millipore 社製) でろ過し、

ウィルスベクターを含む溶液を回収した。

ウィルスベクターを導入される側の心筋細胞への分化能を有するマウス骨髄由来多分化能幹細胞(BMSC)は、ウィルスをインフェクションさせる前日に 2×10^4 細胞/ウェルとなるように6ウェル・ディッシュに蒔いておいた。

上記で取得したウィルスベクターを含む溶液に、終濃度 $8 \mu\text{g/ml}$ となるように、Hexadimethrine bromide(polybrene)(Sigma 社製)を添加し、心筋細胞への分化能を有するマウス骨髄由来多分化能幹細胞(BMSC)の培地と置換し、 33°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 濃度の孵卵機を用いて培養を行った。5時間後、新しい IMDM 培地に交換し、更に 33°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 濃度の孵卵機を用いて培養を行い、さらに2日間培養を行った。

その後、pCLNC-Nkx2.5 と pCMV-Eco 導入で産生されたウィルスをインフェクションした細胞には、G418 を終濃度 $300 \mu\text{g/ml}$ になるように添加し、さらに7日間培養した。

一方、pCLPC-GATA4 と pCMV-Eco 導入で産生されたウィルスをインフェクションした細胞には、ピューロマイシンを終濃度 300ng/ml になるように添加し、さらに7日間培養した。

どちらの細胞も、この間に一部の細胞は死滅して浮遊した。生き残った細胞をトリプシンで浮遊させ、新しい培養皿に播種した。

このようにして、取得した Nkx2.5/Csx あるいは GATA4 の安定形質転換細胞について、上記実施例3の方法により分化誘導を行い、心筋細胞への分化の効率を検定した。

Nkx2.5/Csx を強制発現した心筋細胞への分化能を有する骨髄細胞(BMSC-Nkx2.5)と GATA4 を強制発現した心筋細胞への分化能を有する骨髄細胞(BMSC-GATA4)を 2×10^4 細胞/ml となるように 60mm 培養ディッシュに蒔き、 33°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 濃度の孵卵機を用いて培養を行った。翌日、該培養液に 5-aza-C を終濃度 $3 \mu\text{M}$ となるよう添加した。さらに24時間、 33°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 濃度の孵卵機を用いて培養を行った後に培地を新しいものに交換することで 5-aza-C を除去し、さらに4週間培養を続けた。位相差顕微鏡での筋管様細胞の数は Nkx2.5/Csx あるいは GATA4 の強制発現によっては大きく変化しなかった。次に得られた、筋管様細胞から RNA を回収して、該筋管様細胞で発現している遺伝子を配列番号71~78で示した合成オリゴヌクレオチドを用いて定量的 PCR 解析を行った。その結果、Nkx2.5/Csx あるいは GATA4 の強制発現により心筋に特異的な遺伝子である cTnI, ANP の発現を亢進することが観察された。

次にまず、Nkx2.5/Csx と GATA4 の両遺伝子を同時に心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞に発現させる目的で、レトロウイルスベクタープラスミド pCLPC-GATA4 を、上述した方法に従い、組み換えウイルスを生産し、Nkx2.5/Csx を強制発現させた心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞(BMSC-Nkx2.5)に感染させた後、300ng/ml の終濃度になるようにピューロマイシンを添加し、薬剤耐性クローン(BMSC-Nkx2.5-GATA4)を取得した。

Nkx2.5/Csx と GATA4 の両遺伝子を強制発現した心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞(BMSC-Nkx2.5-GATA4)を 2×10^4 細胞/ml となるように 60mm 培養ディッシュに蒔き、33°C、5%CO₂ 濃度の孵卵機を用いて培養を行った。

翌日、該培養液に 5-aza-C を終濃度 3 μ M となるよう添加した。さらに 24 時間、33°C、5%CO₂ 濃度の孵卵機を用いて培養を行った後に培地を新しいものに交換することで 5-aza-C を除去し、さらに 4 週間培養を続けた。位相差顕微鏡での筋管様細胞の数は Nkx2.5/Csx と GATA4 の両遺伝子の強制発現によっては大きく変化しなかったが、拍動する心筋細胞の数は両遺伝子を強制発現していない心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞と比較して 50 倍以上増加した。次に得られた、筋管様細胞から RNA を回収して、該筋管様細胞で発現している遺伝子を配列番号 71~78 で示した合成オリゴヌクレオチドを用いて定量的 PCR 解析を行った。その結果、Nkx2.5/Csx と GATA4 の強制発現により心筋に特異的な遺伝子である cTnI, ANP の発現を亢進することも観察された。

実施例 7. 転写因子の強制発現とサイトカインの組み合わせによる心筋細胞分化の促進

上述した心筋分化促進能のある転写因子(Nkx2.5/Csx, GATA4)とサイトカイン(FGF-8, ET-1, Midkine, BMP4)を組み合わせることによる、心筋細胞分化に及ぼす影響を解析した。

Nkx2.5/Csx と GATA4 の両遺伝子を強制発現した心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞(BMSC-Nkx2.5-GATA4)を 2×10^4 細胞/ml となるように 60mm 培養ディッシュに蒔き、33°C、5%CO₂ 濃度の孵卵機を用いて培養を行った。

Nkx2.5/Csx と GATA4 の両遺伝子を強制発現した心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞(BMSC-Nkx2.5-GATA4)を 2×10^4 細胞/ml となるように 60mm 培養ディッシュに蒔き、33°C、5%CO₂ 濃度の孵卵機を用いて培養を行った。翌日、該培養液に 5-aza-C を終濃度 3 μ M となるよう添加した上で、更に、FGF-8 を終濃度 10ng/ml になるように添加（培養デ

イッシュI)、ET-1を終濃度10ng/mlになるように添加(培養ディッシュJ)、Midkineを終濃度10ng/mlになるように添加(培養ディッシュK)、BMP4を終濃度10ng/mlになるように添加(培養ディッシュL)、添加なし(培養ディッシュM)の5種類の異なる処理を行い培養を継続した。

翌日5-aza-Cを培地から除去するために、培地を新しいものに交換し、再び培養ディッシュIにはFGF-8を終濃度10ng/mlになるように添加し、培養ディッシュJにはET-1を終濃度10ng/mlになるように添加、培養ディッシュKにはMidkineを終濃度10ng/mlになるように添加、培養ディッシュLにはBMP4を終濃度10ng/mlになるように添加して培養を継続した。それから更に2日後、4日後にも同様の培地交換とFGF-8, ET-1, MidkineあるいはBMP4の添加を行った。

5-aza-Cを加えてから4週間後、細胞の形態を位相差顕微鏡下で観察した。その結果、5-aza-Cのみを添加した培養ディッシュでは約3割の細胞が筋管様細胞となるのに対し、FGF-8, ET-1, MidkineあるいはBMP4を添加した培養ディッシュでは約5割の細胞が筋管様細胞となった。一方、拍動する心筋の数はFGF-8, ET-1, MidkineあるいはBMP4の添加により増加しなかった。

次に得られた、筋管様細胞からRNAを回収して、該筋管様細胞で発現している遺伝子を配列番号71～78で示した合成オリゴヌクレオチドを用いて定量的PCR解析を行った。その結果、FGF-8, ET-1, MidkineあるいはBMP4はNkx2.5/CsxとGATA4の強制発現により促進されるcTnI, ANPの発現をさらに亢進することはなかった。

実施例8. 心筋細胞への分化能を有するマウス骨髓細胞の心臓への移植

心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞が生体内で心筋に分化し心臓に定着するかどうかを明らかにするために、実施例5で作製した、GFPで標識した心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞(BMSC-GFP)を、マウスへ移植するためのドナー細胞とした。具体的には、以下の方法を実施した。GFPで標識したBMSC細胞を予め5-aza-Cで24時間処理した後、 1×10^8 cells/mlとなるようPBSに懸濁し、移植直前まで氷上で保存した。なお、BMSC細胞は0.05%エリスロシン染色により95%程度生存していることを確認している。

一方、レシピエントのC3H/Heマウス(日本チャールズリバー社製)は、エーテルを用いて麻酔の導入を行い、テルモ製のテルモシリンジ(1ml)を用いてチオペンタール30mgの腹腔

内投与することで麻酔の維持を行った。マウスの四肢をテープでコルク板に固定し、さらに首が反り返るように上顎をゴムでコルク板に固定した。この時点で左右の上肢及び右下肢に心電図電極を刺入し心電図のモニタリングを行った。続いて、メーヨ剪刀(NONAKA RIKAKI CO.,LTD NK-174-14)で頸部を気管にそって1 cm ほど切開し、白十字社のベビー綿棒で甲状腺を左右に剥離をし、気管周囲の筋肉をマイクロ剪刀(NONAKA RIKAKI CO.,LTD NY-334-08)で切開し気管を露出した。ついでマイクロフェザー(メス)で気管を1mm ほど切開しここからJ 型に変型させたテルモ製サーフローフラッシュ(22G)の針を挿入し口腔から外に出し、この針をガイドにサーフローフラッシュ(20G)の外筒を気管内に挿入した。この外筒にレスピレータ(シナノ製作所製の MODEL SN-480-7)をつなぎ 100 パーセント酸素を1ml/分で流し、一回換気量は1ml、呼吸回数は120/分で人工呼吸を開始した。このときにガイド針を挿入した穴からエアーがもれるので気管周囲の皮膚をモスキート鉗子(NONAKA RIKAKI CO.,LTD)を用いて気管をおおうようにして閉鎖した。つぎに、胸骨柄より頸部に向かい2cm ほどメーヨ剪刀で切開、ついで胸骨を2cm ほど胸骨柄から頸部に向かい切開をした。出血をバイポーラの電気メスで止血し、テルモ製のテルモシリンジ(1ml)にジーエルサイエンス社製の30Gの針(メタルハブ交換針 N730)をつけて心尖部にドナー細胞をPBSに浮遊した液体を0.1ml 注入した。ついでETHICON 社製の4-0 ETHIBOND X761を用いて胸骨の閉鎖、皮膚の閉鎖を行い、同じ針糸で頸部の皮膚の閉鎖をした。自発呼吸の出現を確認しレスピレータをはずしインファントウオーマーを37℃に加熱しこの中で覚醒を待った。なお本実験の操作はDESIGN FOR VISION 4.5× SURGICAL TELESCOPESを用いて行った

移植して77日後のマウスから組織を摘出し、10%ホルマリンで固定し、パラフィンで包埋した。包埋した組織サンプルをミクロトームで6 μ mの厚さに薄切し、予め poly-L-lysine でコーティングしておいたスライドガラス上に貼り付けた。100%キシレンに浸して脱パラフィンをした後、エタノールで洗浄し、更に0.3% H_2O_2 溶液に30 分間浸して抗体反応の前処理をおこなった。

その後、PBS で洗浄したサンプルに対し、5%正常ブタ血清溶液を30 分間反応させ、ブロッキングをおこなった。ブロッキング後、PBS で洗浄し、PBS で100 倍に希釈したマウス抗 GFP モノクローナル抗体(CLONTECH 社製)で4℃に一晩置き、抗体反応をおこなった。P

BSで洗浄後、パーオキシダーゼ標識デキストラン結合ヤギ抗マウスイムノグロブリン抗体(DACO 社製)を室温で 30 分間反応させた。更に PBS で洗浄後、発色液[10 μ g/ml 3,3'-Diaminobenzidine(DAB) Tetrahydrochloride)、0.01% H_2O_2 、0.05M Tris-HCl(pH6.7)]を添加して10分間程度反応をおこない、PBSで洗浄して反応を停止させた。更に、そのスライドガラスに対して、メチルグリーン染色もおこなった。

一方、組織切片の形態を明らかにするため、連続切片の一部をヘマトキシリン・エオジンで染色した。

その結果、心筋細胞および血管内皮細胞において、GFP 抗体陽性細胞が見られた。従って、マウス骨髄細胞は、移植により心筋細胞および血管内皮細胞に分化したといえる。

実施例9. 培養心筋細胞由来の因子による骨髄細胞の心筋分化促進

実施例8で示したように、心筋細胞への分化能を有する骨髄細胞(BMSC)を心臓に移植することで心筋への分化が観察された。この結果は、心筋細胞自身が骨髄細胞を心筋細胞へ分化誘導する因子を発現している可能性を示唆している。この仮説を検証する目的で妊娠 16 日目の C3H/He マウスから胎児心臓を摘出し、公知の方法(心臓血管研究方法の開発。江橋節朗編集、学会出版センター発行、1983)に従って、心筋細胞の初代培養細胞を樹立した(以後、培養心筋細胞と称する)。

まず、培養心筋細胞から分泌される因子に心臓分化を促進させる活性があるかどうかを検証するために、培養心筋細胞を 6cm の培養ディッシュに 5×10^6 cells を 72 時間培養した後、培養上清を 0.45 μ m のフィルター(Millipore 社製)でろ過し、ろ過した培養上清と等量の培地を加えて、培養心筋細胞から分泌される因子を含む培養液(以後コンディションド・ミイデイアムと称する)を調整した。

あらかじめ心筋細胞への分化能を有する骨髄細胞(BMSC)あるいは Nkx2.5 と GATA4 の両遺伝子を強制発現した心筋細胞への分化能を有する骨髄細胞(BMSC-Nkx2.5-GATA4)を 6cm の培養ディッシュに 1×10^5 細胞となるよう培養し、その後コンディションド・ミイデイアムと培地を置換した。このとき同時に 5-aza-C を終濃度 3 μ M になるように添加した。翌日、培地を新しいコンディションド・ミイデイアムに交換し、さらに 4 週間培養を続けた。この間、3 日に一度培地を新しいコンディションド・ミイデイアムと交換した。その結果、コンディションド・ミイデイアムの添加により、心筋細胞への分化能を有する骨髄幹細胞(BMSC)

からの筋管様細胞の増加は観察されなかったが、ANP,cTnI の二つの心筋特異的な遺伝子の発現が亢進することが観察された。一方、Nkx2.5 と GATA4 の両遺伝子を強制発現した心筋細胞への分化能を有する骨髄細胞(BMSC-Nkx2.5-GATA4)はコンディションド・ミイディアムの添加により、筋管細胞の数は増加せず、ANP,cTnI の二つの心筋特異的な遺伝子の発現は Nkx2.5 と GATA4 以上による発現亢進と同じレベルであり、促進効果は観察されなかった。

次に、心筋細胞が発現している細胞外基質(ECM)に心筋分化促進活性があるかどうかを検証するために、心筋細胞を培養した培養ディッシュから 0.45%のトリプシン・EDTA を 30 分間程度処理することで心筋細胞を除去し、培養心筋細胞の細胞外基質をコートした培養ディッシュ(以後 ECM コート・ディッシュと称する)を作製した。次に、この 6cm の ECM コート・ディッシュ上に心筋細胞への分化能を有する骨髄細胞(BMSC)あるいは Nkx2.5 と GATA4 の両遺伝子を強制発現した心筋細胞への分化能を有する骨髄細胞(BMSC-Nkx2.5-GATA4)を 1×10^5 細胞となるよう培養し、その後 5-aza-C を終濃度 $3 \mu\text{M}$ になるように添加した。翌日、5-aza-C を除去するために新しい培地に交換し、さらに 4 週間培養を続けた。この間、3 日に 1 回程度、培地を新しいものに交換した。心筋細胞への分化能を有する骨髄細胞(BMSC)は ECM コート・ディッシュにより筋管様細胞の数は増加しなかったが、ANP,cTnI の二つの心筋特異的な遺伝子の発現が亢進することが観察された。一方、Nkx2.5 と GATA4 の両遺伝子を強制発現した心筋細胞への分化能を有する骨髄細胞(BMSC-Nkx2.5-GATA4)は ECM コート・ディッシュにより、筋管細胞の数は増加せず、ANP,cTnI の二つの心筋特異的な遺伝子の発現は Nkx2.5 と GATA4 以上による発現亢進と同じレベルであり、促進効果は観察されなかった。

次に、 2×10^4 個の培養心筋細胞と、 8×10^4 個の心筋細胞への分化能を有する骨髄細胞(BMSC)または 8×10^4 個の Nkx2.5 と GATA4 の両遺伝子を強制発現した心筋細胞への分化能を有する骨髄細胞(BMSC-Nkx2.5-GATA4)とを 6cm の培養ディッシュで共培養を行った。培養心筋細胞と骨髄細胞を識別するために、2 種類の骨髄細胞(BMSC と BMSC-Nkx2.5-GATA4)は実施例 5 で示した方法により GFP で標識したものを利用した。共培養を開始した翌日に 5-aza-C を終濃度 $3 \mu\text{M}$ になるように添加し、その翌日に 5-aza-C を除去するために新しい培地に交換し、さらに 4 週間培養を続けた。この間、3 日に 1 回程度、培

地を新しいものに交換した。その結果、BMSCまたはBMSC-Nkx2.5-GATA4を単独で培養したときと比較して、約10倍拍動する心筋の数が増加した。この結果、Nkx2.5とGATA4遺伝子の強制発現と心筋細胞との共培養を組み合わせることで、心筋分化効率は500倍以上上昇することが明らかになった。

実施例10. KUM2細胞とBMSC細胞の表面抗原の解析

KUM2細胞とBMSC細胞の異同を明らかにすること、骨髓中から効率的に心筋形成能を有する単離・精製するために、KUM2細胞とBMSC細胞の表面抗原の解析を行った。

解析に用いたのは、血管内皮細胞の表面抗原として知られているCD105、Flk-1、CD31、CD144、造血系細胞の表面抗原として知られているCD34、CD117(c-kit)、CD14、CD45、CD90、Ly6A/E(Sca-1)、Ly6c、Ly6g、間葉系細胞の表面抗原として知られているCD140、インテグリンCD49b、CD49d、CD29マトリックス受容体CD54、CD102、CD106、CD44の20種類である。

まずKUM2細胞およびBMSC細胞の各 1×10^4 個を96ウェルU字プレートにそれぞれ分注した。公知の方法[酵素抗体法:学際企画刊(1985)]でビオチン標識した抗マウスCD105抗体(Pharmingen社製)をFACS用緩衝液(1%BSA-PBS、0.02%EDTA、0.05%NaN₃、pH7.4)に加え各ウェルに添加し、氷中で30分間反応させた。コントロール抗体としては、ラットIgG2a、 κ 精製抗体(Pharmingen社製)を用いた。緩衝液で2回洗浄後、ストレプトアビジン-PE(日本ベクトン・ディッキンソン社製)を20 μ l加えた。遮光し氷中で30分間反応後、緩衝液で3回洗浄し、最終的に500 μ lに懸濁して、フローサイトメーターで蛍光強度を測定し、抗体の添加により蛍光強度が増加するか否かで抗体の発現の有無を調べた。その結果を第1図に示す。KUM2細胞およびBMSC細胞はともにCD105陰性であった。

Flk-1抗原の発現についても、上記と同様の方法によりビオチン化した抗マウスFlk-1抗体(Pharmingen社製;PM-28181D)を用いて抗体反応をおこない、フローサイトメーターで測定した。その結果を第2図に示す。KUM2細胞およびBMSC細胞はともにFlk-1陰性細胞であった。

CD31抗原の発現については、FITC標識された抗マウスCD31抗体(Pharmingen社製;PM-01954D)を用いて抗体反応をおこない、フローサイトメーターで測定した。その結果を第3図に示す。KUM2細胞およびBMSC細胞はともにCD31陰性であった。

CD144 抗原の発現については、ビオチン化した抗マウス CD144 抗体 (Pharmingen 社製; PM-28091D) を用いて抗体反応を行い、フローサイトメーターで測定した。その結果を第4図に示す。KUM2 細胞は CD144 陰性細胞であったが、BMSC 細胞は CD144 弱陽性細胞であった。

CD34 抗原の発現については、FITC 標識された抗マウス CD34 抗体 (Pharmingen 社製; PM-09434D) を用いて抗体反応を行い、フローサイトメーターで測定した。その結果を第5図に示す。KUM2 細胞は CD34 陰性細胞であったが、BMSC 細胞は CD34 陽性細胞と陰性細胞の混合物であった。

CD117 (c-kit) 抗原の発現については、FITC 標識された抗マウス CD117 抗体 (Pharmingen 社製; PM-01904D) を用いて抗体反応を行い、フローサイトメーターで測定した。その結果を第6図に示す。KUM2 細胞は CD117 陰性細胞であったが、BMSC 細胞は CD117 陽性細胞であった。

CD14 抗原の発現については、FITC 標識した抗マウス CD 14抗体 (Pharmingen 社製; PM-09474) を用いて抗体反応を行い、フローサイトメーターで測定した。その結果を第7図に示す。KUM2 細胞は CD14 陽性細胞であったが、BMSC 細胞は CD14 陰性細胞であった。

CD45 抗原の発現については、FITC 標識した抗マウス CD45 抗体 (Pharmingen 社製; PM-01114) を用いて抗体反応を行い、フローサイトメーターで測定した。その結果を第8図に示す。KUM2 細胞および BMSC 細胞はともに、CD45 陰性細胞であった。

CD90 抗原の発現については、FITC 標識した抗マウス CD90 抗体 (Pharmingen 社製; PM-22214) を用いて抗体反応を行い、フローサイトメーターで測定した。その結果を第9図に示す。KUM2 細胞および BMSC 細胞はともに、CD90 陰性細胞であった。

Ly6A/E(Sca-1) 抗原の発現については、FITC 標識した抗マウス Ly6A/E(Sca-1) 抗体 (Pharmingen 社製; PM-01164A) を用いて抗体反応を行い、フローサイトメーターで測定した。その結果を第10図に示す。KUM2 細胞および BMSC 細胞はともに、Ly6A/E(Sca-1) 陽性細胞であった。

Ly6c 抗原の発現については、FITC 標識した抗マウス Ly6c 抗体 (Pharmingen 社製; PM-01152) を用いて抗体反応を行い、フローサイトメーターで測定した。その結果を第11

図に示す。KUM2 細胞および BMSC 細胞はともに、Ly6c 陽性細胞であった。

Ly6g 抗原の発現については、FITC 標識した抗マウス Ly6g 抗体 (Pharmingen 社製; PM-01214) を用いて抗体反応を行い、フローサイトメーターで測定した。その結果を第12図に示す。KUM2 細胞および BMSC 細胞はともに、Ly6g 陰性細胞であった。

CD140 抗原の発現については、ビオチン化した抗マウス CD140 抗体 (Pharmingen 社製; PM-28011A) を用いて抗体反応を行い、フローサイトメーターで測定した。その結果を第13図に示す。KUM2 細胞および BMSC 細胞はともに、CD140 陽性細胞であった。

CD49b 抗原の発現については、FITC 標識した抗マウス CD49b 抗体 (Pharmingen 社製; PM-09794) を用いて抗体反応を行い、フローサイトメーターで測定した。その結果を第14図に示す。KUM2 細胞は CD49b 陽性細胞であったが、BMSC 細胞は CD49b 陰性細胞であった。

CD49d 抗原の発現については、FITC 標識した抗マウス CD49d 抗体 (Pharmingen 社製; PM-01274) を用いて抗体反応を行い、フローサイトメーターで測定した。その結果を第15図に示す。KUM2 細胞および BMSC 細胞はともに、CD49d 陰性細胞であった。

CD29 抗原の発現については、FITC 標識した抗マウス CD29 抗体 (Pharmingen 社製; PM-22634) を用いて抗体反応を行い、フローサイトメーターで測定した。その結果を第16図に示す。KUM2 細胞および BMSC 細胞はともに、CD29 陽性細胞であった。

CD54 抗原の発現については、FITC 標識した抗マウス CD54 抗体 (Pharmingen 社製; PM-01544) を用いて抗体反応を行い、フローサイトメーターで測定した。その結果を第17図に示す。KUM2 細胞は CD54 陽性細胞であったが、BMSC 細胞は CD54 陰性であった。

CD102 抗原の発現については、FITC 標識した抗マウス CD102 抗体 (Pharmingen 社製; PM-01804) を用いて抗体反応を行い、フローサイトメーターで測定した。その結果を第18図に示す。KUM2 細胞および BMSC 細胞はともに、CD102 陰性細胞であった。

CD106 抗原の発現については、FITC 標識した抗マウス CD106 抗体 (Pharmingen 社製; PM-01814) を用いて抗体反応を行い、フローサイトメーターで測定した。その結果を第19図に示す。KUM2 細胞は CD106 陽性細胞であったが、BMSC 細胞は CD106 陰性細胞であった。

CD44 抗原の発現については、FITC 標識した抗マウス CD44 抗体 (Pharmingen 社製;

PM-28154)を用いて抗体反応を行い、フローサイトメーターで測定した。その結果を第20図に示す。KUM2 細胞および BMSC 細胞はともに、CD44 陽性細胞であった。

表1にフローサイトメーターで測定した解析結果をまとめた。

表1

| | KUM2 | BMSC |
|--------------------|------|------|
| Homato | | |
| CD34 | - | +*1 |
| CD117(c-kit) | - | + |
| CD14 | + | - |
| CD45 | - | - |
| CD90(Thy1) | - | - |
| Ly-6a/e(Sca1) | + | + |
| Ly6c | + | + |
| Ly6g | - | - |
| Endothelial | | |
| Flk-1 | - | - |
| CD31 | - | - |
| CD105 | - | - |
| CD144 | - | +*2 |
| Mesenchyami | | |
| CD140 (PDGFR) | + | + |
| Integrin | | |
| CD49b(α 2) | + | - |
| CD49d(α 4) | - | - |
| CD29(β 1) | + | + |
| Matrix | | |
| CD54(ICAM-1) | + | - |
| CD102(ICAM-2) | - | - |
| CD106(VCAM-1) | + | - |
| CD44(Hyaluronate) | + | + |

*1:混合物 *2:弱陽性

実施例11. マウス MLC2v プロモーターを利用した分化前駆細胞の濃縮

心筋細胞への分化を有するマウス骨髄由来細胞から心筋に分化する細胞を効率よく取得するため、心筋細胞に特異的に発現するマウス MLC2v(myosin light chain-2v)遺伝子のプロモーター発現系を構築した。具体的には、マウス MLC2v 遺伝子のプロモーター配列下に EGFP 遺伝子(CLONTECH 社製)をつなぎ、neomycin 耐性遺伝子の発現ユニット含んだ pMLC-2-EGFP プラスミドを構築した。このプラスミドの DNA を、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989)等に記

載のアルカリ中和法により取得した。

上記 DNA 2 μ g を、予め6穴プレートに 1×10^6 個となるように培養しておいた KUM2 細胞に対し、リポフェクトアミン (LIFE TECHNOLOGY 社製) を用いて遺伝子導入をおこなった。具体的な方法は製品の添付プロトコルに従った。遺伝子導入して 48 時間後に G418 (Sigma 社製) を終濃度 1mg/ml となるよう添加し、生存している遺伝子導入細胞だけを選択した。

遺伝子を導入して 14 日目の細胞に対し、5-aza-C を終濃度 3 μ M となるように添加し、24 時間後に培地を交換して、分化誘導をおこなった。分化誘導後、3 日目より GFP 陽性細胞が観察された。分化誘導後 4 日目の細胞うち、 1×10^4 個の細胞を FACS Caliber (Becton Dickinson 社製) で GFP 陽性細胞のみを分取し更に培養を続けた。その結果、9 割以上の細胞が筋管様構造を有する細胞に分化しており、効率的に分化する細胞を濃縮できたといえる。この GFP 陽性細胞は FACS で分取後、実施例 10 の方法に従い、移植を行うと血管内皮への分化は認められず、骨格筋や心筋などの筋肉系組織への分化が特異的に観察された。

実施例 12. 心筋細胞への分化能を有するマウス骨髓細胞からの脂肪細胞の誘導

心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞 (BMSC) は心筋細胞以外に脂肪細胞に分化誘導することができる。この脂肪細胞への分化を制御する目的で分化誘導条件の検討を行った。まず、PPAR- γ 受容体の発現を定量的 PCR 法により解析を行った結果、BMSC 細胞は PPAR- γ 1 受容体は発現しているが、PPAR γ 2 受容体は発現していないことが観察された。次に、PPAR- γ 受容体のアゴニストである Pioglitazone、Trogliatzone を、様々な濃度で心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞 (BMSC) に添加したところ、濃度依存的に脂肪細胞分化が促進され、0.4 μ M で約 50%、2 μ M ではほぼ 100% の細胞が脂肪細胞へと分化した。

実施例 13. 心筋細胞への分化能を有するマウス骨髓細胞を胚盤胞への移植による神経系細胞、肝細胞、心筋細胞への分化誘導

はじめに、心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞 (BMSC) を GFP で標識した安定形質転換細胞を得るため、以下の方法で遺伝子導入をおこなった。

まず、レトロウイルスベクタープラスミド pCLNCX (Imgenex 社) に GFP を組み込み、

pCLNC-GFP を調製した。レトロウイルスベクタープラスミド pCLNC-GFP と Ecotropic 遺伝子を発現させる pCMV-Eco プラスミドベクター (Imgenex 社) を、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) 等に記載のアルカリ中和法および PEG 沈殿法を用いて、純度の高い DNA を取得した。

これらの DNA をトランスフェクションさせる前日に、コンフルエントになった、gag および pol 遺伝子を保有する 293 細胞を 1/5 希釈で 10cm ディッシュに継代し、一晚 37°C、5%CO₂ 濃度の孵卵機を用いて培養を行った。

トランスフェクションは以下の通りにおこなった。

pCLNC-GFP レトロウイルスベクタープラスミド DNA 15 μ g と pCMV-Eco プラスミドベクター DNA 5 μ g を 250mM CaCl₂ (pH6.95) 0.5ml に加えて溶解させ、その溶液を 15ml のチューブに入れた 2×BBS [50mM BES(N,N-bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethanesulfonic acid)、280mM NaCl、1.5mM Na₂HPO₄ (pH6.95)] 0.5ml に滴下して 10 分間室温で静置させた。その後、この DNA 溶液を、前日に用意した 293 細胞培地中に滴下させ、37°C、5%CO₂ 濃度の孵卵機を用いて培養を行った。翌日、培地を交換し、更に 37°C、5%CO₂ 濃度の孵卵機を用いて培養を行った。

培地を交換して 2 日後に、培養上清を 0.45 μ m のフィルター (Millipore 社製) でろ過し、ウイルスベクターを含む溶液を回収した。

ウイルスベクターを導入される側の心筋細胞への分化能を有するマウス骨髄細胞 (BMSC) は、ウイルスをインフェクションさせる前日に 2×10⁴ 細胞/ウェルとなるように 6ウェル・ディッシュに蒔いておいた。

上記で取得したウイルスベクターを含む溶液に、終濃度 8 μ g/ml となるように、Hexadimethrine bromide (polybrene) (Sigma 社製) を添加し、心筋細胞への分化能を有するマウス骨髄細胞 (BMSC) の培地と置換し、33°C、5%CO₂ 濃度の孵卵機を用いて培養を行った。5 時間後、新しい IMDM 培地に交換し、更に 33°C、5%CO₂ 濃度の孵卵機を用いて培養を行った。

2 日間培養を行った後、G418 を終濃度 300 μ g/ml になるように添加し、さらに 7 日間培養した。この間に一部の細胞は死滅して浮遊した。生き残った細胞をトリプシンで浮遊させ、新しい培養皿に播種した。

このようにして取得した、GFP 標識された心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞を、6cm の培養ディッシュで増殖させ、培地を除去後、0.5ml の 0.25% のトリプシン EDTA を添加して1分間処理した後、1.5ml の新しい培地を添加して、細胞を懸濁したところに、ウシ胎児血清(Lexicon Genetics 社製)を加えて混合し、該細胞懸濁液をマウス胚盤胞への注入に用いた。マウス胚盤胞は過排卵処理を施した雌の C57Bl/6J マウスを同系の雄マウスと自然交配させ、4 日後に摘出した子宮の内部を M15 培地で灌流することにより取得した。これらを 37°C、5% CO₂ 条件下で胚盤胞腔が十分に膨らむまで放置した後、約 4°C に冷却した 20mM の HEPES を含む M15 培地中に移し、マイクロインジェクター(成茂科学社製)及びマイクロマニピュレーター(成茂科学社製)を装備した倒立顕微鏡(ニコン社製)下で観察しながら、注入針を操作し 10~15 個の BMSC 細胞を胚盤胞腔内へ顕微注入した。該胚盤胞を 37°C、5% CO₂ 条件下で胚盤胞腔が膨らむまで放置した後、Manipulating the Mouse Embryo A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1994)に記載の方法に従い、偽妊娠の雌 MCH 系統のマウスの卵管側子宮部分に移植後、着床させた。

偽妊娠の雌 MCH 系統のマウスは、10 週以降の精管結紮雄 MCH 系統マウスと移植 3 日前の 17:00 に 1:1 で同居、交配させ、翌朝 9:00 に腔栓確認を行い、2 日後に上記の目的で使用した。

誕生したマウスを解剖して、臓器を摘出し、GFP の発現を観察した。その結果、脳内ならびに肝臓で GFP の発現が観察され BMSC が神経系ならびに肝臓に分化することが示された。また、別の個体から取得した心臓より、ゲノム DNA を取得し、配列番号 79、80 のプライマーを用いて PCR を行った結果、BMSC が心臓にも取り込まれことが確認された。これらの結果は、BMSC が、神経、心臓、肝臓の 3 胚葉すべてに分化できる全能性を有していることを示した。

実施例 14. 心筋細胞への分化能を有するマウス骨髓細胞でのテロメラーゼ活性

心筋細胞への分化能を有するマウス骨髓細胞のテロメラーゼ活性は Telomeric Repeat Amplification Protocol (TRAP) 法により検討した (Oncor 社製 TRAPeze Telomerase Detection Kit)。テロメラーゼ活性の測定は原則的に添付されていたプロトコールに従ったが、具体的には以下の通りに行った。まず、6cm 径の培養皿上で培養した心筋細胞への分化能を有するマウス骨髓細胞(およそ 10⁶ 個)を PBS で洗浄した後、200 μl の 1×CHAPS

液を加え、氷上で 30 分間静置した。その後、溶液と共に細胞を 1.5ml 容遠沈管に回収し、14,000rpm で 20 分間遠心分離(4℃、HITACHI 社製 himacCF15)し、上清を細胞抽出液として回収した。Protein assay (BioRad 社製)を用いて蛋白質含有量を測定したところ、上記条件で取得した心筋細胞への分化能を有するマウス骨髄細胞の細胞抽出液はおおよそ 1mg/ml であった。

次にこの細胞抽出液を用いて、プロトコールに従ってテロメア伸長反応及び PCR 増幅を行った。Taq ポリメラーゼは EX Taq polymerase (宝酒造製)を用いた。反応終了後の試料は 10×染色液(0.25% bromophenol blue, 0.25% Xylene cyanol FF, 30% glycerol)を 1/10 量添加し、12.5%ポリアクリルアミドゲル (TRAPeze Telomerase Detection Kit のプロトコールに記載されている通り調製)に載せ、250mV 定電圧下で泳動した。泳動後、ゲルをサイバーグリーン (FMC 社製)で染色し、蛍光色素分析装置、Fluorolmager (Molecular Dynamics 社製)を用いて解析した。その結果、細胞抽出液の終濃度が 0.4~4 μ g/ml の試料でテロメラーゼ活性が検出された。

実施例 15. ラット骨髄からの心筋細胞への分化能を有する骨髄細胞の取得と培養

5週齢の Wistar rat (日本 SLC 株式会社)雌6匹を頸椎脱臼した後、70%エタノールを充分かけ消毒した。次に足部の皮膚を広範囲に渡り切開し、大腿骨や脛骨を覆う筋肉を切除しながら、大腿骨と脛骨を取り出した。取り出した大腿骨と脛骨は PBS (GibcoBRL 社製)の入った 10cm 径培養皿 (岩城硝子社製)に移し、筋肉及び関節を完全に切除した。続いてこれらの骨の両端をハサミで切り、20G 注射針を付けた 10ml 用注射器 (テルモ社製)を用いて、培養液 (D-PBS、GibcoBRL 社製)の水流で骨髄中の内容物を押し出した。取得した細胞塊はさらに注射器を通して一様になるようにほぐした。このようにして得た細胞浮遊液は 50ml 容遠沈管 (BECTON DICKINSON 社製)に回収し、1,500rpm で 10 分間遠心分離し (TOMY 社製低速遠心機)、沈殿した細胞を 6ml の D-PBS 中に懸濁した。改良ノイバウエル型血球計算盤にて細胞数を計測したところ、回収した細胞は合計 2.6×10^9 個であった。大腿骨または脛骨 1 本当たりから 1×10^8 個の細胞を回収したことになる。回収した細胞は 1ml 当たり 1.3×10^8 個の濃度になるよう希釈し、50ml 容遠沈管に入った 1.073g/ml に調製された Percoll (Amersham Pharmacia Biotech 社製)/D-PBS 液 (25ml) 上に 5ml 重層した後、室温で 3,100rpm で 30 分間遠心分離した。遠心分離後、Percoll 液と細胞浮遊液との界面

より細胞を回収し、D-PBS で 4 倍に希釈した後、2300rpm で 10 分間遠心分離し、分画した細胞集団を回収した。回収した細胞は 20%FCS、100 μ g/ml penicillin, 250 ng/ml streptomycin, 85 μ g/ml amphotericin (GibcoBRL 社製)を含む IMDM 培地 (GibcoBRL 社製)に懸濁した。この時点で再度細胞数を計測したところ、回収した骨髓由来細胞は合計 4.7×10^7 個あり、処理前の細胞の約 2%相当を回収したことになる。このようにして分画した骨髓由来細胞は $2 \sim 5 \times 10^5$ 個/cm² になるように 10cm 径の動物細胞用の培養皿 (岩城硝子社製、以下 10cm 培養皿と略す) 3枚に撒き、CO₂ 培養器 (タバイ社製) にて 33°C、5%CO₂ 濃度で培養を開始した。培地は 24 時間後、72 時間後にそれぞれ半分交換した。その 3～4 日後に培地を半分交換した。15 日経過し、コロニーが密集してきたので、細胞をトリプシン EDTA 処理ではがし、2/3 は 4ml の保存液 (10%DMSO、50%の骨髓由来細胞培養上清、40%の未使用上記培地) に懸濁し、2ml 容チューブ (住友ベークライト社製) に 1 本当たり 1ml 分注して凍結保存し、残り 1/3 は 10cm 培養皿 2 枚に蒔き直し継代した。

実施例 16. ラット骨髓由来細胞の心筋細胞への分化能の検討

上記で継代したラット骨髓由来細胞は密集したところを再度トリプシン EDTA 処理ではがし、6 ウェルプレート (BECTON DICKINSON 社製) には 1 ウェル当たり 5×10^4 個になるように、またヒトフィブロネクチンをコートした 6cm 径の培養皿 (BECTON DICKINSON 社製 Biocoat) には 1.3×10^5 個になるように細胞を蒔き直した。1 日後に 5-アザシチジン (Sigma 社製、終濃度 10 μ M) のみを加えたものと、5-アザシチジン、PDGF-BB (Pepro Tech EC LTD. 社製、終濃度 10ng/ml)、all-trans レチノイン酸 (RA、Sigma 社製、終濃度 10^{-9} M) を加えた二種類の異なる培養条件培養を行い、2 日間培養した後に培地を交換した (後者の場合は培地交換時に再度 PDGF、all-trans レチノイン酸を加え、2 日後と 4 日後にさらに加えた)。その 3～4 日後に、培地を交換し、3 週間培養した。その結果 5-アザシチジン、PDGF-BB、レチノイン酸を加えたもので筋管様細胞の分化が観察された。

実施例 17. 転写因子 MesP1 の強制発現およびサイトカイン添加による心筋細胞分化の促進

心筋細胞への分化能を有する骨髓細胞 (BMSC) に、心筋細胞分化に関係する転写因子 MesP1 を強制的に発現させることによる心筋細胞への分化に与える影響、および MesP1 の強制発現とサイトカイン (FGF-8, ET-1, Midkine, BMP4) の添加とを組み合わせることによる

心筋細胞への分化に与える影響を解析した。

実施例6で示した方法と同様の方法で、レトロウィルスベクターを用いて、MesP1 遺伝子を強制発現した心筋細胞への分化能を有する骨髄細胞(BMSC-MesP1)を取得し、その後分化誘導させて心筋細胞への分化の効率を検討した。

MesP1 を強制発現した心筋細胞への分化能を有する骨髄細胞(BMSC-MesP1) を 2×10^4 細胞/ml となるように 60mm 培養ディッシュに蒔き、33°C、5%CO₂ 濃度の孵卵機を用いて培養を行った。翌日、該培養液に 5-aza-C を終濃度 3 μ M となるように添加した後、更に、FGF-8 を終濃度 10ng/ml になるように添加（培養ディッシュN）、ET-1 を終濃度 10ng/ml になるように添加（培養ディッシュP）、Midkine を終濃度 10ng/ml になるように添加（培養ディッシュQ）、BMP4 を終濃度 10ng/ml になるように添加（培養ディッシュR）、添加なし（培養ディッシュS）の5種類の異なる処理を行い培養を継続した。

翌日 5-aza-C を培地から除去するために、培地を新しいものに交換し、再び培養ディッシュNには FGF-8 を終濃度 10ng/ml になるように添加し、培養ディッシュPには ET-1 を終濃度 10ng/ml になるように添加、培養ディッシュQには Midkine を終濃度 10ng/ml になるように添加、培養ディッシュRには BMP4 を終濃度 10ng/ml になるように添加して培養を継続した。それから更に 2 日後、4 日後にも同様の培地交換と FGF-8, ET-1, Midkine あるいは BMP4 の添加を行った。

5-aza-C を加えてから4週間後、細胞の形態を位相差顕微鏡下で観察した。その結果、MesP1 の強制発現によって筋管様細胞の数は大きく変化しなかった。また、FGF-8, ET-1, Midkine あるいは BMP4 を添加した培養ディッシュでは約 5 割の細胞が筋管様細胞となった。

次に、得られた筋管様細胞から RNA を回収して、該筋管様細胞で発現している遺伝子を配列番号71～78で示した合成オリゴヌクレオチドを用いて定量的 PCR 解析を行った。その結果、MesP1 の強制発現により心筋に特異的な遺伝子である ANP の発現が亢進された。一方、FGF-8, ET-1, Midkine あるいは BMP4 は MesP1 の強制発現により促進される ANP の発現をさらに亢進することはなかった。

産業上の利用可能性

本発明によれば、心筋細胞の破壊ならびに変性を伴う心疾患の治療ならびに治療薬の探索に有効な骨髄細胞、増殖因子、ビタミン、接着分子、及びこれらの利用法が提供される。

「配列表フリーテキスト」

配列番号33－人工配列の説明:合成 DNA

配列番号34－人工配列の説明:合成 DNA

配列番号35－人工配列の説明:合成 DNA

配列番号36－人工配列の説明:合成 DNA

配列番号37－人工配列の説明:合成 DNA

配列番号38－人工配列の説明:合成 DNA

配列番号39－人工配列の説明:合成 DNA

配列番号40－人工配列の説明:合成 DNA

配列番号41－人工配列の説明:合成 DNA

配列番号42－人工配列の説明:合成 DNA

配列番号43－人工配列の説明:合成 DNA

配列番号44－人工配列の説明:合成 DNA

配列番号45－人工配列の説明:合成 DNA

配列番号46－人工配列の説明:合成 DNA

配列番号47－人工配列の説明:合成 DNA

配列番号48－人工配列の説明:合成 DNA

配列番号49－人工配列の説明:合成 DNA

配列番号50－人工配列の説明:合成 DNA

配列番号51－人工配列の説明:合成 DNA

配列番号52－人工配列の説明:合成 DNA

配列番号53－人工配列の説明:合成 DNA

配列番号54－人工配列の説明:合成 DNA

配列番号55－人工配列の説明:合成 DNA

配列番号56－人工配列の説明:合成 DNA

配列番号57—人工配列の説明:合成 DNA
配列番号58—人工配列の説明:合成 DNA
配列番号59—人工配列の説明:合成 DNA
配列番号60—人工配列の説明:合成 DNA
配列番号61—人工配列の説明:合成 DNA
配列番号62—人工配列の説明:合成 DNA
配列番号63—人工配列の説明:合成 DNA
配列番号64—人工配列の説明:合成 DNA
配列番号65—人工配列の説明:合成 DNA
配列番号66—人工配列の説明:合成 DNA
配列番号67—人工配列の説明:合成 DNA
配列番号68—人工配列の説明:合成 DNA
配列番号69—人工配列の説明:合成 DNA
配列番号70—人工配列の説明:合成 DNA
配列番号71—人工配列の説明:合成 DNA
配列番号72—人工配列の説明:合成 DNA
配列番号73—人工配列の説明:合成 DNA
配列番号74—人工配列の説明:合成 DNA
配列番号75—人工配列の説明:合成 DNA
配列番号76—人工配列の説明:合成 DNA
配列番号77—人工配列の説明:合成 DNA
配列番号78—人工配列の説明:合成 DNA
配列番号79—人工配列の説明:合成 DNA
配列番号80—人工配列の説明:合成 DNA